

**A PARI fehérje szerepe a
rekombináció-függő folyamatok
szabályozásában
elakadt replikációs villa esetén**

Ph.D. értekezés

Hegedűs Lili

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2021

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	1
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
3. BEVEZETÉS.....	8
3.1. DNS-hibák és következményeik.....	8
3.2. DNS-hibajavító útvonalak	9
3.2.1. Homológ rekombináció.....	11
3.3. Az elakadt replikációs villa menekítése.....	13
3.3.2. A PCNA fehérje és poszttranszlációs módosításai elakadt replikációs villa esetén	16
3.3.3. Srs2-szerű helikázok szerepe az elakadt replikációs villa menekítésében	18
3.3.3.1. A PARI fehérje jellemzése	20
4. CÉLKITŰZÉS	21
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	23
5.1. A kísérletek során felhasznált tápoldatok	23
5.2. A kísérletek során felhasznált antibiotikumok (végkoncentráció).....	23
5.3. A kísérletek során felhasznált ellenanyagok.....	23
5.4. A kísérletek során felhasznált oldatok	24
5.5. PCR primerek és egyéb oligonukleotidok	24
5.6. A kísérletek során felhasznált plazmidok	25
5.7. A kísérletek során használt sejtvonalak	26
5.8. A kísérletek során használt baktériumtörzsek	26
5.9. A kísérletek során alkalmazott módszerek	26
5.9.1. Restrikciós endonukleázzal történő emésztés	26
5.9.2. A klónozások során alkalmazott PCR.....	26
5.9.3. DNS fragmentumok izolálása agaróz gélből és PCR termék tisztítása.....	27
5.9.4. Ligálás	27
5.9.5. LR reakció	27
5.9.6. PARI csendesítő és expressziós vektorok klónozása	28

5.9.7. Plazmidtisztítás baktériumból	28
5.9.8. Baktérium transzformálása.....	28
5.9.9. Humán sejt kultúrák transzfektálása Lipofectamine 2000 reagenssel	28
5.9.10. A stabil sejtvonalak készítése.....	29
5.9.11. Gélelektroforézis és western blot	29
5.9.12. Áramlási citométer alapú túlélési kísérlet	29
5.9.13. Homológ rekombináció vizsgálata.....	30
5.9.14. A sejtek immunfestése	30
5.9.15. Kromoszómaaberrációs vizsgálatok.....	31
5.9.16. A biokémiai kísérletekhez szükséges fehérjék tisztítása.....	31
5.9.16.1. A teljes hosszúságú PARI fehérje tisztítása	31
5.9.16.2. Az N-terminális deléciót tartalmazó PARI ₃₃₃₋₅₇₉ fehérjék tisztítása	31
5.9.17. A PCNA <i>in vitro</i> SUMOilációja	32
5.9.18. A D-hurok meghosszabbítását vizsgáló <i>in vitro</i> rendszer.....	32
6. EREDMÉNYEK.....	34
6.1. A PARI fehérje részt vesz az elakadt replikációs villák menekítésében	34
6.2. A PARI fehérje gátolja a homológ rekombinációt <i>in vivo</i>	38
6.3. A PARI fehérje PIP és SIM motívumai fontos szerepet töltenek be a rekombinációs folyamatok szabályozásában.....	41
6.4. A PARI fehérje lokalizációja főként a PIP doménjétől függ.....	45
6.5. A PARI és a SUMOilálódni nem képes PCNA kolokalizációja sérül.....	47
6.6. A PARI fehérje túltermelése genomi átrendeződésekhez vezethet	49
6.7. A PARI fehérje gátolja a D-hurok meghosszabbítását <i>in vitro</i>	51
6.8. A PARI fehérje helikáz doménje nem szükséges a D-hurok meghosszabbításának gátlásában.....	53
6.9. A PARI fehérje PIP doménje nélkülözhetetlen a D-hurok meghosszabbításának gátlásában.....	54
7. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	55

8. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	59
9. SUMMARY OF THE THESIS	63
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	67
12. IRODALOMJEGYZÉK	69

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATP	Adenozin-trifoszfát
BER	Bázis kivágó DNS-hibajavítás (Base excision repair)
BIR	Törés-indukált replikáció (Break induced replication)
BLM	Bloom helikáz
BRCA2	Breast cancer 2
BSA	Borjú szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
cDNS	Intronokat nem tartalmazó, gént kódoló DNS (complementary DNA)
CHK2	A sejtciklust szabályozó fehérje (Checkpoint kinase 2)
CSA	Cockayne syndrome A
CSB	Cockayne syndrome B
DAPI	4,6-diamidino-2-phenilindol
dATP	Deoxiadenozin-trifoszfát (deoxyadenosine triphosphate)
dCTP	Deoxicitidin-trifoszfát (deoxycytidine triphosphate)
D-hurok	A rekombináció során kialakuló köztes szerkezet (Displacement-loop)
dHJ	dupla Holliday Junction
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, tápoldat humán sejteknek
DMSO	Dimetil-szulfoxid (Dimethyl sulfoxide)
DNS	Dezoxiribonukleinsav
dNTP	Dezoxinukleotid-trifoszfát (deoxynucleotide triphosphate)
DPC	DNS-fehérje keresztkötés (DNA-protein crosslink)
DR-GFP	Homológ rekombinációt mérő sejt alapú riporterrendszer elnevezése
dTTP	Dezoxitimidin-trifoszfát (deoxythymidine triphosphate)
E1	Ubiquitin/SUMO aktiváló enzim
E2	Ubiquitin/SUMO konjugáló enzim
E3	Ubiquitin/SUMO ligáz enzim
ECL	Megnövekedett kemilumineszcencia (Enhanced chemiluminescence)
FBH1	F-Box DNA helicase 1
FBS	Magzati borjú szérum albumin (Fetal Bovine Serum)
Flag	Flag epitóp tag
FP	Frog Prince transzpozáz
GFP	Zöld fluoreszcens protein (Green Fluorescent Protein)

GST	Glutation S-transzferáz (Glutathione S-transferase)
HA	Hemagglutinin epitóp tag
HEK293	Humán embrionális vesesejtből származó sejtvonal (Human embryonic kidney cell)
HeLa	Méhnyakrákból származó sejtvonal
HLTF	Helicase like transcription factor
HR	Homológ rekombináció
HRP	Torma-peroxidáz (Horseradish peroxidase)
ICL	DNS-szálak közötti kovalens keresztkötés (Interstrand crosslink)
ID	FANCI és FANCD2 fehérjék komplexe
iGFP	Integrált GFP (fragment)
I-SCE I	Intron-encoded endonuclease (<i>S. cerevisiae</i>)
K164R	164. lizin cseréje argininra
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth baktérium tápoldat
LEU	Leucin aminosav
LOH	Heterozigotizmus elvesztése (Loss of heterozygosity)
LR	Gateway klónozó rendszerben alkalmazott rekombináz
Lys	Lizin aminosav
MDC1	Sejtciklust szabályozó fehérje (Mediator of DNA damage checpoint 1)
MBP	Maltózkötő fehérje (Maltose binding protein)
MMR	Nem megfelelően párosodott nukleotidok javítását végző mechanizmus (Mismatch repair)
Mms2	Methyl Methanesulfonate Sensitivity protein 2
Mre11	Meiotic recombination 11 homolog 1
MRN (komplex)	Mre11, Rad50 és Nbs1 fehérjék komplexe
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome protein 1
NE	Nemzetközi egység
NER	Nukleotid kivágó hibajavítás (Nucleotid excision repair)
NHEJ	Nem homológ végek összekapcsolása (Non-homologous end joining)
PARI	PCNA-associated recombination inhibitor
PARBP	PARP-1 binding protein
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCNA	Replikatív polimeráz processzivitási faktora (Proliferating cell nuclear antigen)
PCR	Polimeráz-lánreakció (polymerase chain reaction)
PEG	Polietilén-glikol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i> eredetű DNS polimeráz
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT (signal transducer and activator of transcription)
PIP	PCNA-kölcsönható régió (PCNA-Interacting Protein motif)
PMSF	Fenil-metán-szulfonil-fluorid
pol	Polimeráz
Rad6	Radiation sensitivity protein 6
Rad18	Radiation sensitivity protein 18
Rad50	Radiation sensitivity protein 50
Rad51	Radiation sensitivity protein 51
Rad52	Radiation sensitivity protein 52
Rad54	Radiation sensitivity protein 54
RFC	Replikációs faktor fehérje (Replication factor C)
RNS	Ribonukleinsav
RPA	Replication Protein A
RTEL1	Regulator of telomere elongation helicase 1
SAE1	SUMO-activating enzyme subunit 1
SAE2	SUMO-activating enzyme subunit 2
SceGFP	I-Sce I endonukleáz hasítóhelyet tartalmazó GFP
SDS	Nátrium-dodecil szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
SDSA	Szintézis-függő szálegyesítés (Synthesis dependent strand annealing)
SF9	<i>Spodoptera frugiperda</i> eredetű sejtvonal
S-fázis	Sejtciklus szintetikus fázisa
shRNS	Rövid hajtű RNS (Small hairpin RNA)
SIM	SUMO-interkciós motívum (SUMO interacting motif)
Srs1	ATP-függő helikáz élesztőben
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TC-NER	Transzkripció-kapcsolt nukleotid kivágó hibajavítás (Transcription coupled nucleotide excision repair)

TLS	Transzléziós szintézis (Translesion synthesis)
T-T dimer	Szomszédos T-T nukleotidok között létrejött keresztkötés
UB	Ubiquitin
Uba1	Ubiquitin aktiváló enzim (Ubiquitin activator 1)
Ubc9	Ubiquitin carrier protein 9
Ubc13	Ubiquitin carrier protein 13
UV	Ultraibolya sugárzás
UvrD	ATP-függő helikáz élesztőben domén
XPA-G, V	Xeroderma pigmentosum A-G, V
WB	Western blot

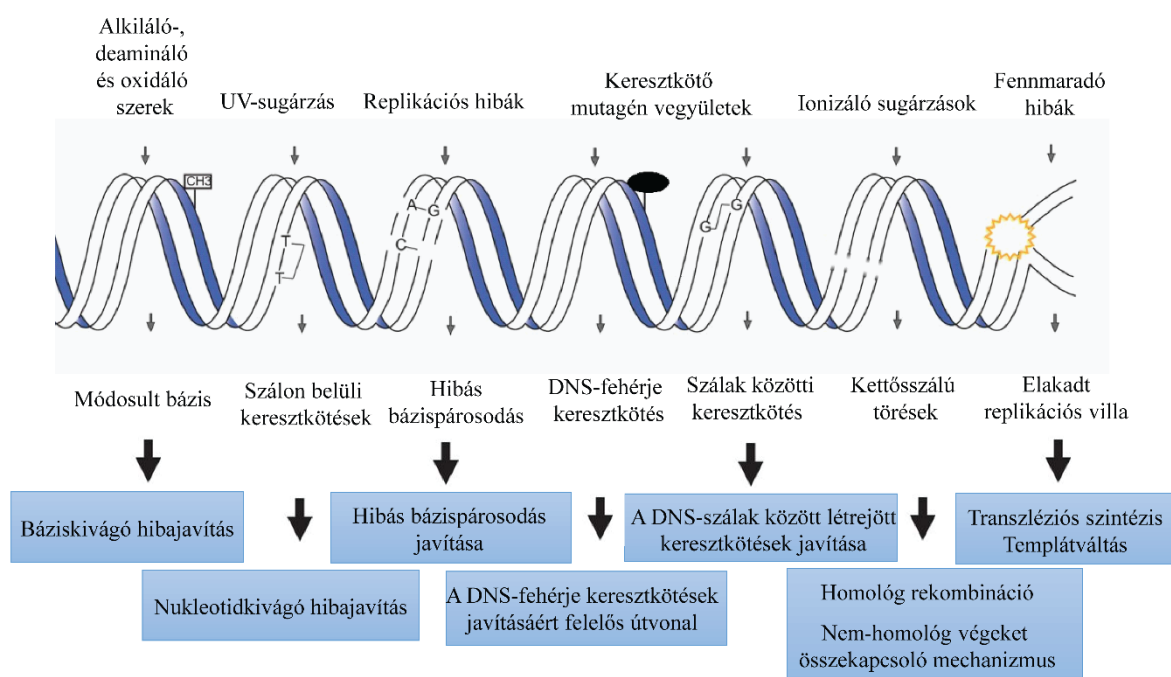
3. BEVEZETÉS

3.1. DNS-hibák és következményeik

Örökítőanyagunk tartalmazza az összes információt, amely nélkülözhetetlen a sejtjeink felépítéséhez és működéséhez, emiatt pontos másolása és szerkezetének megőrzése létfontosságú. Külső és belső forrásból azonban számos károsító hatás érheti, amely megváltoztathatja szerkezetét. Egyes mutagén vegyületek a bázisokat módosíthatják. Ezek lehetnek többek között különféle alkiláló- (pl. metil-metanoszulfát), deamináló- (pl. salétromossav) vagy oxidáló- (pl. hidrogén-peroxid) szerek. UV-sugárzás hatására a kettős hélixen belüli keresztkötések, úgynevezett ciklobután pirimidin dimerek keletkezhetnek. Egyéb vegyületek, mint ciszplatin vagy mitomicin C hatására keresztkötések jöhetnek létre a DNS-szálak, formaldehid hatására pedig a DNS és a hozzá kapcsolódó fehérjék között. Röntgen- és radioaktív sugárzás hatására törések keletkezhetnek a kettősszálú hélixben. Ezekhez hasonló hatások azonban a szervezetből is érkezők: a sejtek anyagcseréje során keletkezhetnek olyan reaktív oxigén gyökök, amelyek szintén károsítják a DNS-t, de maga a replikáció is hibaforrás lehet, így is létrejöhetnek nem a Watson-Crick-párosodásnak megfelelő nukleotidpárok. Az így keletkezett hibák akadályt jelenthetnek a transzkripció és a replikáció számára egyaránt. Ha a transzkripció leáll, az adott génről nem képződhet megfelelő fehérjetermék, ami befolyásolhatja a sejt alapvető funkcióit, anyagcserefolyamatait. Ha a DNS másolását végző replikációs apparátus hibával találkozik, a folyamat leáll. A megakadt replikációs villa egyrészt igen sérülékeny, az egyesszálú DNS-szakaszok eltörhetnek, ami súlyos genomi átrendeződésekhez vezethet, másrészt a befejezetlen replikáció egyrészt sejthalált indukálhat. A DNS-hibák következtében mutációk jöhetnek létre, amelyek megváltoztatják az örökítőanyag információtartalmát, ez pedig befolyásolhatja a sejt működését. Bár a mutációk az evolúció mozgatórugói, felhalmozódásuk a sejtek halálát vagy rákos elfajulását is okozhatja.

3.2. DNS-hibajavító útvonalak

Az örökítőanyag információtartalmának védelmére számos DNS-hibajavító útvonal alakult ki (1. ábra)^{1,2,3}. Ezek nem megfelelő működése nagyon súlyos következményekkel járhat; olyan öröklődő genetikai betegségek kialakulásához vezethet, mint például a Xeroderma pigmentosum, a Werner szindróma, a Bloom szindróma vagy a Fanconi anémia. Ezek nagyon heterogén fenotípussal rendelkeznek, a fejlődési rendellenességektől kezdve a felgyorsult öregedési folyamatokig, azonban közös jellemzőjük a rákra való hajlam^{4,5}.



1. ábra: DNS-hibák és DNS-hibajavító útvonalak⁶

Az evolúció során az egyes hibatípusokra specifikus DNS-hibajavító útvonalak alakultak ki.

A DNS szerkezete nagyon sokféleképp változhat meg az adott mutagén hatásától függően. Az egyes hibatípusokra specifikus hibajavító mechanizmusok alakultak ki. Ezek folyamatosan monitorozzák a genomot hibák után kutatva, és megpróbálják a lehető leggyorsabb és leghatékonyabb módon eltávolítani azokat. A DNS-hibajavító útvonalak főbb lépései a hiba felismerése, a hibás régió eltávolítása, az ezáltal létrejött hiányzó DNS-szakasz feltöltése, és a szabad DNS-végek összekapcsolása.

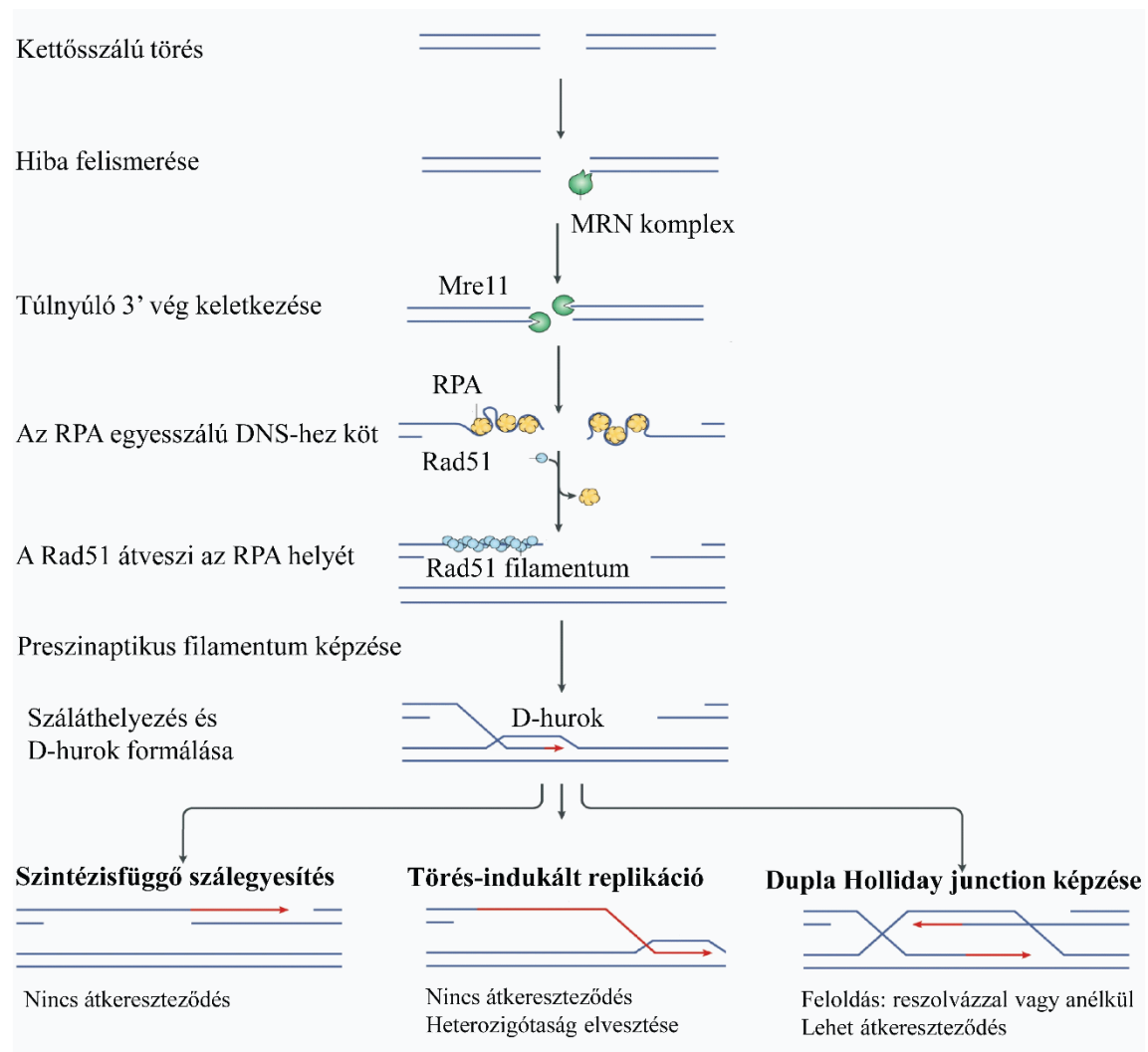
A *bázis kivágó hibajavítás (Base Excision Repair, BER)* a módosult (oxidált, alkilált, deaminált) vagy abázikus helyek javítását végzi⁷. A *nukleotid kivágó hibajavítást (Nucleotide Excision Repair, NER)* a DNS kettősszalú szerkezetében létrejövő torzulás aktiválja⁸. Az útvonalban szereplő gének (XPA-XPG, XPV) mutációi a Xeroderma pigmentosum nevű súlyos öröklődő betegség kialakulásához vezethet. A betegek rendkívül érzékenyek az UV-sugárzásra, amely bőrrák kialakulására hajlamosít⁹. Ha a transzkripció egy hibás nukleotidhoz ér, a másolást végző RNS polimeráz II megáll. Ekkor aktiválódik az úgynevezett *transzkripció-kapcsolt nukleotid kivágó útvonal (Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair, TC-NER)*. A Cockayne-szindróma a folyamatban szereplő gének (CSA és CSB) mutációja következtében kialakuló tünetegyüttes¹⁰. A *hibás bázispárosodás javításáért felelős útvonal (Mismatch Repair, MMR)* a nem megfelelően párosodott, de ép nukleotidok javítását végzi¹¹. A *DNS-fehérje keresztkötések (DPC, DNA-protein crosslink) javításáért felelős útvonal* akkor működik, amikor irreverzibilis kovalens keresztkötés keletkezik a DNS és a hozzá kapcsolódó fehérjék között. Az útvonal legfontosabb lépése a nagyméretű keresztkötött fehérje eltávolítása. Ezt specifikus proteázok végzik. Ezt követi a hibás szakasz eltávolítása NER segítségével. Amennyiben a keresztkötés hatására megáll a replikáció, a DNS-hibatolerancia útvonalak aktiválódnak (ld. 3.3. fejezet)¹². A *DNS-szálak közötti kovalens keresztkötés (ICL, interstrand crosslink) eltávolítása* többféleképp történhet, attól függően, hogy a sejtciklus mely fázisában zajlik a hiba felismerése. Ha ez nem a sejtciklus S-fázisában történik, a hiba eltávolítását a NER végzi. Amennyiben a replikációs apparátus találkozik a hibával, a DNS másolása megáll. Ebben az esetben az úgynevezett *Fanconi anémia útvonal* aktiválódik. A folyamat a nevét egy ritka öröklődő betegségről kapta, melyet az útvonalban szereplő gének (FA) mutációi okoznak. A FA fehérjekomplexek nukleáz komponensei bemetszést ejtenek a hibától meghatározott távolságra. Ezáltal a hibás szakasz kifordul, így a két DNS-szál már nem kapcsolódik kovalensen egymáshoz. Ezt követően aktiválódnak a DNS-hibatolerancia útvonalak, hogy pótolják a hiányzó szakaszt a hibával szemben (ld. 3.3. fejezet)^{13,14}. A DNS szerkezetében létrejövő *kettősszalú törések javítása* két módon történhet. Az egyik a *homológ rekombináció (Homologous recombination, HR)*, a másik a *nem homológ végeket összekapcsoló mechanizmus (Non-Homologous End Joining, NHEJ)*. Ez utóbbi során a keletkezett szabad DNS-végek összekapcsolódnak, amely nukleotid veszteséssel járhat. Így nem áll helyre az eredeti DNS-szekvencia. A sejt ezáltal megőrizheti ugyan életképességét, de igen gyakran vezet deléciók kialakulásához vagy genomi átrendeződésekhez¹⁵.

3.2.1. Homológ rekombináció

Homológ rekombináció esetén a kettősszalú törést az MRN komplex ismeri fel. Ez három fehérjéből áll: Mre11, Rad50 és Nbs1. Az Mre11 (Meiotic Recombination 11) szimplaszál exonukleáz aktivitással rendelkezik. A Rad50 megkötö a szabad DNS végeket, és közel tartja azokat egymáshoz, így elősegítve a későbbi rekombinációs eseményeket. Az Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome 1) fehérje szerepe a sejtciklus szabályozásában van. A károsodás helyére lokalizálja ugyanis az ATM (ataxia-telangiectasia mutated) fehérjét, amely foszforilálja a H2AX hiszton variánst a 139. szerin oldalláncon. Ez jelöli ki a sejt számára a DNS károsodás helyét. Az ATM számos egyéb fehérje foszforilálásában részt vesz, mint például a CHK2 (checkpoint kinase 2), MDC1 (mediator DNA damage checkpoint protein 1), melyek lehetővé teszik, hogy a sejtciklus megálljon az S fázisban és a hiba javítása, és DNS szintézise befejeződhessen^{16,17,18}.

A hiba felismerése után az Mre11 - exonukleáz aktivitásának köszönhetően - 3' túlnyúló végeket hoz létre. Az így keletkezett egyesszalú DNS-szakaszt az RPA fehérje borítja be, hogy megakadályozza, hogy a nukleázok hozzáférjenek a szabad DNS-szakaszokhoz. Ezt követően úgynevezett rekombinációs mediátor fehérjék (pl. BRCA2, Rad52) lehetővé teszik, hogy a Rad51 fehérje átvegye az RPA helyét az egyesszalú DNS-en. Így alakul ki a *preszinaptikus filamentum*. A következő lépés a *száláthelyezés* folyamata, amikor a szabad DNS-szál a homológ régiójához kapcsolódik. Így alakul ki a *D-hurok* (*D-loop*, *Displacement-loop*) struktúra. Ezt a Rad54 fehérje szabályozza. Működése segíti a Rad51-et, ami a homológia keresést és a száláthelyezést végzi. Ezt követi a DNS-szintézise, amelyhez a DNS polimeráz templátként a homológ szakaszt használja. Ezt a folyamatot a *D-hurok meghosszabbításának* is nevezik. Minél hosszabb a D-hurok, annál nagyobb esély van arra, hogy átkereszteződés történjen. A keletkezett struktúrák feloldásának három módja lehetséges. *Szintézisfüggő szálegyesítés* (*SDSA*, *Synthesis dependent strand annealing*) esetén a száláthelyezésben részt vett egyesszalú DNS visszatér az eredeti pozíciójába, a D-hurok anélkül feloldódik, hogy átkereszteződés történne. *Törés-indukált replikáció esetén* (*BIR*, *break induced replication*) a D-hurok nem oldódik fel, a DNS-szintézis végigmegy a DNS teljes hosszán, azaz az egész kromoszómán, ami a heterozigotáság elvesztéséhez vezet (*LOH*, *loss of heterozygosity*). A harmadik esetben ún. *dupla Holliday junction* (*dHJ*) képződik, azaz a másik szabad DNS-vég is kapcsolódik a homológjához. A struktúra feloldása resolvázal vagy anélkül mehet végbe, és eredményezhet átkereszteződéseket. A szabad DNS-végeket minden esetben DNS ligáz kapcsolja össze (2. ábra)¹⁹.

A folyamat során a hiba javítása homológ régiókról - általában az ép testvérkromatidáról - pontos másolással történik. Ez tehát elméletileg hibamentes javítást tesz lehetővé. Azonban a rendszer működése mikrohomológiák keresésén alapul, így ha mégsem a megfelelő szakasznál történik a száláthelyezés, az genomi átrendeződésekhez vezethet. A folyamat pedig igen bonyolult, instabil DNS-struktúrákon keresztül megy végbe, így bármilyen hiba súlyos következményekkel járhat. A rekombináció túlzott vagy nem megfelelően szabályozott működése tehát genomi instabilitáshoz és rák kialakulásához vezethet^{20,21}.



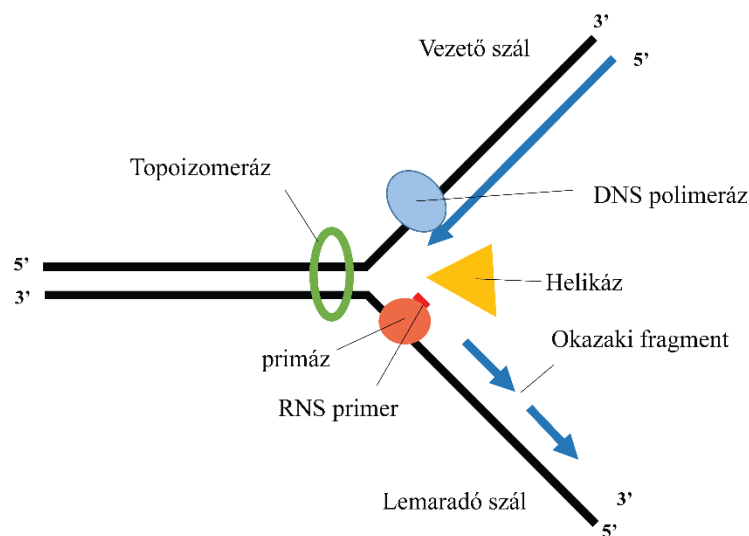
2. ábra: A homológ rekombináció folyamata²²

Az Mre11 exonukleáz túlnyúló 3' végeket hoz létre, melyhez az RPA fehérjék kapcsolódnak. Ennek a helyét veszi át a Rad51, ami iniciálja a száláthelyezést, és a D-hurok képződését. DNS-szintézis (Ez az ún. D-hurok meghosszabbítása) követően három kimenetele lehet a folyamatnak. *Szintézisfüggő szálegyesítés* esetén feloldódik a D-hurok, és nem történik átkereszteződés. *Törés-indukált replikáció* esetén a D-hurok fennmarad, és a replikáció a homológ szálról folytatódik. Átkereszteződés nem történik, de heterozigotáság elvesztéséhez vezethet. *Dupla Holliday junction* keletkezésekor a másik szabad DNS-vég is kapcsolódik a megfelelő homológ szakaszhoz. Feloldása történhet reszolvázzal vagy anélkül. Átkereszteződésekre is vezethet.

3.3. Az elakadt replikációs villa menekítése

3.3.1. A DNS replikációja

A replikáció, azaz a DNS pontos másolása létfontosságú a sejtek számára. A folyamat során adódik át a genetikai információ az utódsejteknek, ami meghatározza az új sejt felépítését és működését. A replikáció a sejtciklus S-fázisában történik. Ekkor a DNS kettős spirálja helikázok segítségével felnyílik. A DNS helikális szerkezete miatt ez torziót hoz létre, amit a topoizomeráz enzimek korrigálnak. A létrejött egyszálú DNS szolgál templátként a replikatív polimerázok számára. Ez a szerkezet az úgynevezett replikációs villa. A DNS megkettőződése a replikációs origónál kezdődik, ahol egy primáz enzim egy rövid RNS szakaszt szintetizál, melyet a DNS polimerázok képesek folytatni. A replikáció mindig 5'-3' irányba történik, így a replikációs villa vezető-szálán folyamatosan, a lemaradó-szálnál pedig szakaszosan történik. Ezeket a kis DNS-szakaszokat nevezzük Okazaki fragmentumoknak. Ezeket ligáz enzim kapcsolja össze (3. ábra)^{23,24}.



3. ábra: A DNS replikációja

A DNS kettősszálú spirált helikázok nyitják fel. A replikáció egy rövid RNS szakasz szintézisével indul, melynek meghosszabbítását DNS polimerázok végzik. A DNS szintézise mindig 5'-3' irányba történik, amely a vezető-szálon folyamatos, a lemaradó-szálon szakaszos.

A replikációt végző polimerázok nagyon pontosan másolnak, ráadásul rendelkeznek egy hibajavító („proofreading”) aktivitással is, amely minimalizálja annak lehetőségét, hogy az újonnan szintetizálódott szálba hibás nukleotid épüljön be. Ezek az enzimek nagyon szűk aktív centrummal rendelkeznek, ami nagyban hozzájárul a nagyfokú pontosságukhoz, ugyanakkor emiatt csak az ép nukleotidokat képesek befogadni²⁵.

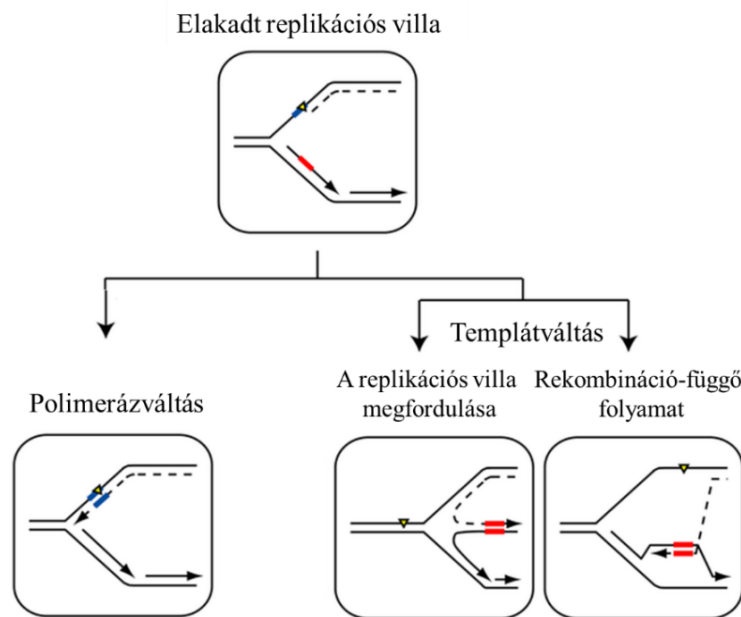
Ha egy DNS-hiba fennmarad a sejtciklus S-fázisáig, akadályt jelenthet a másolást végző replikációs apparátus számára, ezért a DNS-sérülést tartalmazó szakaszhoz érve a replikáció megáll. Az elakadt replikációs villa nagyon sérülékeny, a hosszan tartó állás során az egyesszállú DNS-régiói eltörhetnek, ami kettősszállú lánctöréseket, ezáltal genomi átrendeződéseket eredményezhet, másrészt a befejezetlen replikáció sejthalált indukálhat²⁶. A sejtek számára tehát létfontosságú, hogy a replikáció folytatódjon a sejtciklus S-fázisában. Ennek megoldásaként alakultak ki az úgynevezett *DNS-hibatolerancia útvonalak*. Ebben az esetben a hiba javítása nem, vagy csak később, más mechanizmussal történik meg, a cél azonban az, hogy a replikáció a lehető legrövidebb ideig akadjon meg és a hiba ellenére is be tudjon fejeződni. Így teszi lehetővé a sejt túlélését a hiba ellenére is²⁷.

Az egyik lehetséges útvonal a *polimerázváltás*. Az evolúció során ugyanis kialakultak olyan DNS polimerázok, amelyeknek - a replikatív polimerázokkal ellentétben - tágabb az aktív centrumuk, így képesek a hibás nukleotidokat is befogadni, és velük szemben nukleotidokat beépíteni. Ezek az úgynevezett *transzléziós polimerázok*. Ezek az enzimek azonban gyakran vétenek hibát (a módosulást nem tartalmazó DNS-szálon is), és nem rendelkeznek saját hibajavító ("proofreading") aktivitással sem, ezáltal mutációkat hozhatnak létre (1. táblázat). Túlzott működésük tehát súlyos következményekkel járhat. Ennek elkerülése érdekében ezek a polimerázok kis processzivitással rendelkeznek, így működésük általában csak egy rövid DNS-szakaszra korlátozódik. A transzléziós polimerázok az Y (Pol η , Pol ι , Pol κ és a REV1) és B (Pol ζ) polimerázok családjába tartoznak^{28,29}. Közülük a polimeráz η mégis hibamentes átírást végez, ugyanis képes az UV-sugárzás következtében létrejött T-T dimerekkel szemben a megfelelő nukleotidokat beépíteni. Hibás működése a Xeroderma pigmentosum variant nevű betegség kialakulásához vezethet, amely az UV-sugárzás következtében létrejött bőrrák kialakulásának kockázatát extrém módon megnöveli^{30,31}.

Család	Polimeráz	Funkció	3'-5' exonukleáz aktivitás ("proofreading")	Hiba nukleotidonként
B	δ	replikáció	van	$10^{-5} - 10^{-7}$
	ϵ	replikáció	van	$10^{-5} - 10^{-7}$
	ζ	TLS extenzió	van/nincs	$10^{-3} - 10^{-6}$
Y	η	TLS	nincs	$10^{-2} - 10^{-4}$
	ι	TLS	nincs	$10^{-3} - 10^{-4}$
	κ	TLS	nincs	$10^{-3} - 10^{-4}$
	Rev1	TLS	nincs	—

1. táblázat: A replikatív és TLS polimerázok összehasonlítása³²

A másik útvonal az úgynevezett *templátváltás*. A folyamat során a replikációs apparátus a hibás szál helyett az újonnan szintetizálódott, hibamentes DNS-szálat fogja templátként használni a másoláshoz. A folyamat során tehát nem keletkezik pontmutáció. A templátváltás két módon is megvalósulhat. Az egyik a *replikációs villa megfordulása*, a másik pedig egy *rekombináció-függő folyamat*. A rekombináció-függő útvonalban Rad51-vezényelt módon, száláthelyezést követően valósul meg a DNS-másolása, amely során a DNS polimeráz templátként egy homológ régiót használ. Így a replikációs apparátus kikerüli a hibás szakaszt. Szabályozatlan működése azonban genomi átrendeződésekhez vezethet (4. ábra)^{33,34,35,36,37}.



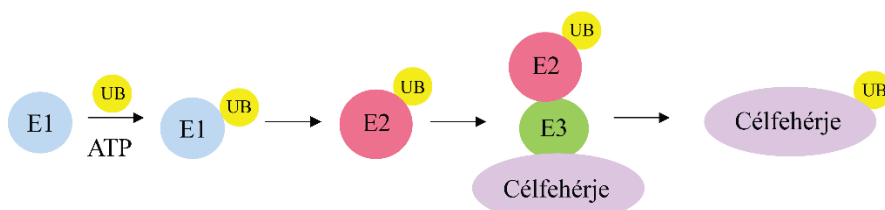
4. ábra: Az elakadt replikációs villa mentése³⁸

A *polimerázváltás* során olyan DNS polimerázok végzik a másolást, amelyek képesek nukleotidot beépíteni a hibával szemben. A *templátváltással* járó folyamatokban általában az újonnan szintetizálódott hibamentes szál szolgál mintaként a DNS szintézishez.

3.3.2. A PCNA fehérje és poszttranszlációs módosításai elakadt replikációs villa esetén

Az elakadt replikációs villa menekítése szigorú szabályozás alatt áll, melyben kulcsszerepet töltenek be a PCNA fehérje poszttranszlációs módosításai. A folyamat alapos feltérképezése élesztőben végzett vizsgálatokkal valósult meg. Bár az élesztőben leírt mechanizmusok nagyrésze humán sejtekben is megtalálható, szerepük nem minden esetben kizárólagos. A humán rendszer sokkal összetettebb, és a résztvevő fehérjék nagyfokú redundanciát mutatnak^{38,39}. Az egyszerűség kedvéért dolgozatomban azokra a folyamatokra világítok rá, amelyek konzerváltak eukarióta sejtekben; csak a témához szorosan kapcsolódó esetekben hangsúlyozom ki a fontosabb evolúciós különbségeket.

A PCNA fehérjét a replikatív DNS polimeráz processzivitási faktoraként írták le. Gyűrű alakú homotrimert képez a DNS körül, ahova az RFC fehérje tölti fel, ugyanis képes kinyitni a gyűrűszerű szerkezetét, majd a DNS körül bezárni azt. A PCNA fehérjének emellett szabályozó funkciója is ismert, amelyet poszttranszlációs módosításai segítenek^{40,41}. A PCNA fehérjének számos poszttranszlációs módosítása ismert (acetiláció, foszforiláció, ubiquitiláció, SUMOiláció, stb.)^{42,43}. Egyelőre a PCNA ubiquitilációjának és SUMOilációjának a működési mechanizmusa ismert részleteiben. Megállt replikációs villa esetén a PCNA fehérje ubiquitilálódik a 164. lizin oldalláncán⁴⁴. Az ubiquitin egy 76 aminosavból álló, konzervált fehérje, amely a célfehérje lizin aminosavához képes kovalensen kapcsolódni. Az ubiquitiláció folyamata során az ubiquitin először az *ubiquitin aktiváló enzim*hez kapcsolódik (*E1*), majd átkerül az *ubiquitin konjugáló enzim*re (*E2*). Ezután az *ubiquitin ligáz* (*E3*) segítségével a célfehérjéhez kötődik (5. ábra)⁴⁵.



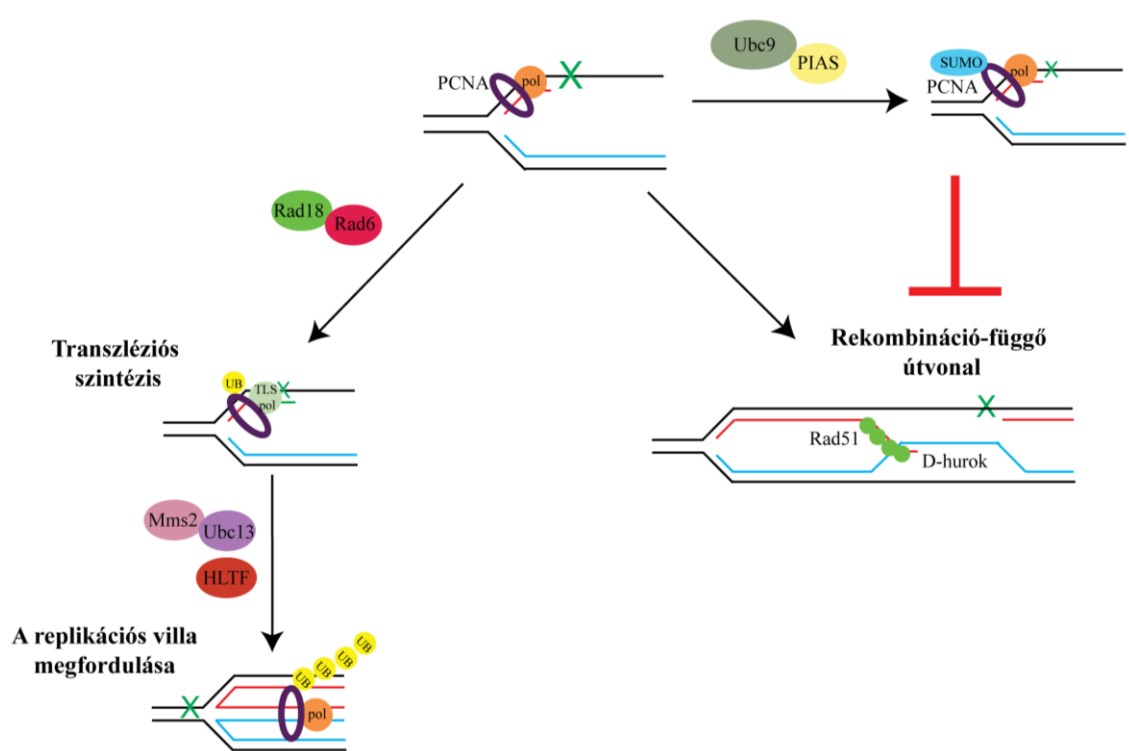
5. ábra: Az ubiquitiláció folyamata

Az ubiquitin először az E1 ubiquitin aktiváló enzimhez, ezt követően az E2 ubiquitin konjugáló fehérjéhez kapcsolódik. A szubsztráthoz az E3 ubiquitin ligáz enzim kapcsolja.

PCNA fehérje esetében E1 enzimként az Uba1 fehérje, E2 enzimként a Rad6, E3 enzimként pedig a Rad18 fehérje működik^{43,46}. A PCNA azonban nem csak monoubiquitilálódhat, hanem poliubiquitilálódhat is. Ebben az esetben a PCNA fehérjén lévő monoubiquitin 63. lizinjéhez kapcsolódnak további ubiquitin molekulák. Ezt az Mms2-Ubc13- (E2), és HLTF-(E3) fehérjék végzik^{47,48}.

A PCNA SUMOizálódni is képes. A SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) elsősorban a PCNA 164. lizinjéhez (kis mértékben a 127. lizinjéhez) kapcsolódik⁴⁹. A SUMO fehérje 12 kDa. Négy izoformája ismert emberben (SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO4), szemben az élesztő egy SUMO fehérjéjével. A SUMO4 fehérje azonban csak igen ritkán, extrém éhezés esetén fordul elő a sejtekben^{50,51,52}. A SUMOizáció az ubiquitilációhoz hasonlóan zajlik. Ehhez is szükség van E1, E2, illetve E3 enzimekre. PCNA esetében a SAE1-SAE2 fehérjék töltik be a *SUMO-aktivátor (E1)*, az Ubc9 a *SUMO-konjugáló (E2)*, a PIAS 1-4 fehérjék pedig a *SUMO-ligáz (E3)* szerepét^{53,54}.

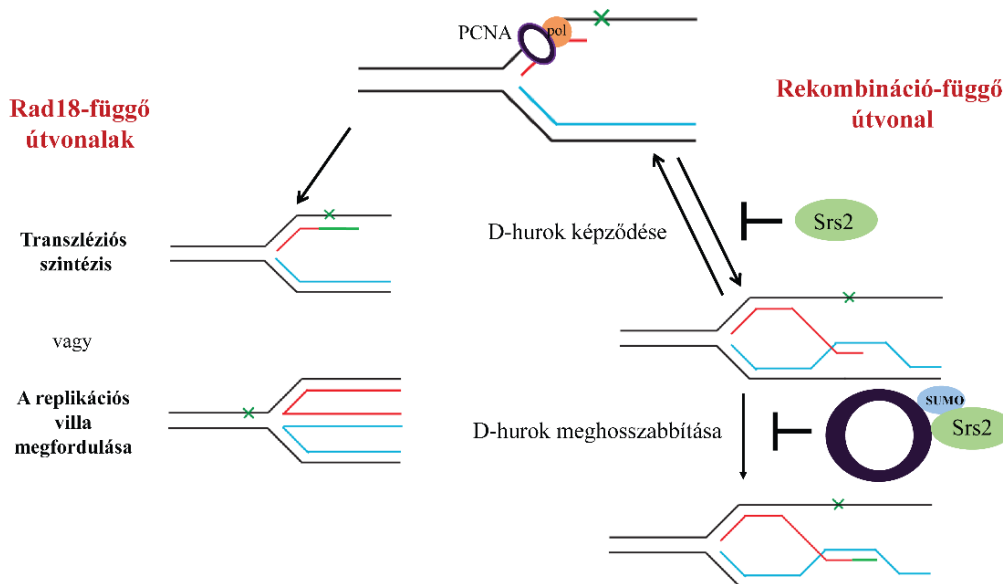
A PCNA poszttranszlációs módosításai különböző folyamatokat indítanak el. A PCNA monoubiquitilálása a polimerázváltásban játszik szerepet. A poliubiquitilált PCNA jelzésként szolgál a replikációs villa megfordulásához, melynek köszönhetően a hibamentes testvérkromatida szolgál templátként a DNS szintéziséhez. A SUMOizált PCNA pedig a rekombináció-függő folyamatokat gátolja elakadt replikációs villa esetén, így a replikációs villa menekítése nem rekombinációval, hanem a Rad18-függő DNS-hibatolerancia útvonalak révén történik. Tehát a PCNA-t tekinthetjük egy molekuláris kapcsolónak ezekben a folyamatokban (6. ábra)^{46,55,56,57}.



6. ábra: Az elakadt replikációs villa mentése és a PCNA poszttranszlációs módosításai
Elakadt replikáció esetén a PCNA monoubiquitilálódik. Ez teszi lehetővé a polimerázváltást, amely során egy TLS polimeráz nukleotidot épít be a hibával szemben. A PCNA poliubiquitilációja a replikációs villa megfordulását indítja el, melynek során az újonnan szintetizálódott, hibamentes szál fog templátként szolgálni a DNS-szintézishez. A replikációs villa menekítése megtörténhet rekombináció-függő módon is. A SUMOizált PCNA ezt a folyamatot gátolja.

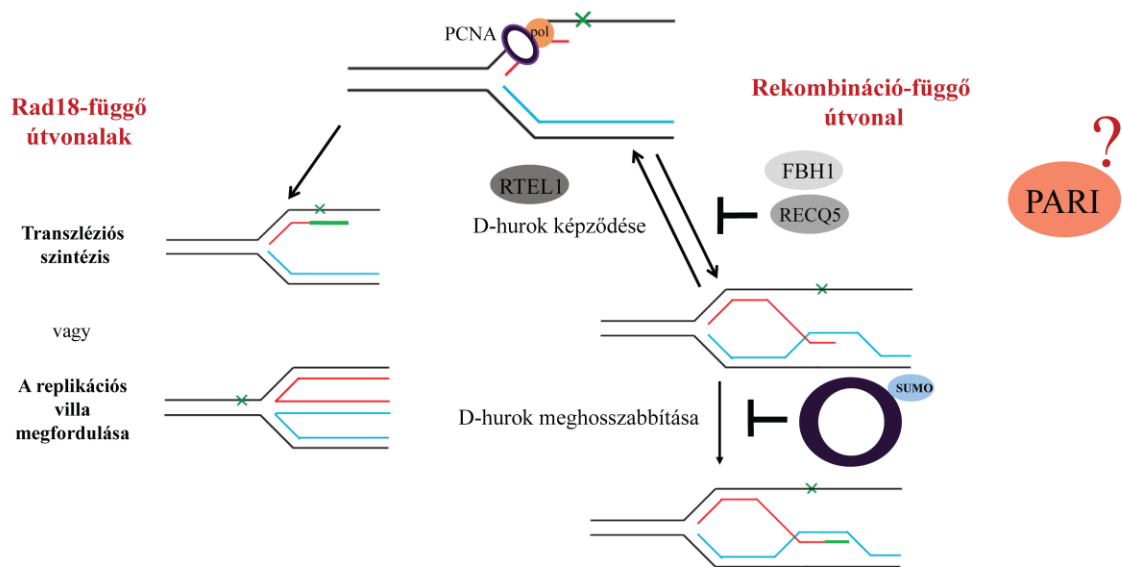
3.3.3. Srs2-szerű helikázok szerepe az elakadt replikációs villa menekítésében

Saccharomyces cerevisiae-ben az elakadt replikációs villa menekítésekor szerepet játszó szabályozó mechanizmusokat részletesen feltérképezték. Elsőként élesztőben mutatták ki, hogy a SUMOilált PCNA gátolja a rekombináció-függő útvonalat elakadt replikációs villa esetén⁴⁹. Ugyancsak *Saccharomyces cerevisiae*-ben végzett vizsgálatok világítottak rá arra, hogy az Srs2 fehérje szintén gátolja ugyanezt a mechanizmust. Ezt kísérletesen úgy mutatták ki, hogy az *SRS2* gén deléciója szuppresszálta a *RAD18*-deléciók sejt UV-érzékenységét. Ennek magyarázata az volt, hogy amennyiben az UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa menekítése nem a Rad18-függő útvonalak révén valósul meg, akkor a rekombináció-függő folyamat veszi át a szerepét. Ha az Srs2 fehérje jelen van a sejtekben, az gátolja ezt, így a hibatolerancia rekombinációval sem valósulhat meg, emiatt a sejtek nagyfokú érzékenységet mutatnak UV-sugárzással szemben. Az Srs2 hiánya szabad utat enged a rekombináció-függő útvonalnak, így a sejtek kevésbé lesznek érzékenyek az UV-sugárzásra⁵⁸. Azt már ismerjük, hogy az Srs2 fehérje milyen biokémiai mechanizmusok segítségével gátolja a rekombinációt. Az Srs2 egy ATP-függő DNS helikáz, ami képes megkötni a Rad51 fehérjét, majd szétszerelni a preszinaptikus filamentumot, illetve helikáz aktivitásának köszönhetően feloldja a D-hurkot^{59,60,61,62,63}. A SUMO-PCNA szerepe kevésbé ismert, de korábban kimutattuk, hogy a SUMO-PCNA az Srs2-vel együttműködve (de annak Rad51 interakciójától és helikáz aktivitásától függetlenül) képes meggátolni a D-hurok meghosszabbítását, és iniciálni a D-hurok feloldását (7. ábra)^{64,65}.



7. ábra: Az élesztő Srs2 fehérje szerepe a rekombináció-függő folyamatok gátlásában
Élesztőben az Srs2 több mechanizmussal is képes gátolni a rekombináció-függő folyamatokat. Rad51-kötése és helikáz aktivitása révén szétszereli a képződött D-hurkot, SUMO-PCNA-függő módon pedig megakadályozza a D-hurok meghosszabbítását.

Humán sejtekben a rekombináció-függő folyamat gátlása elakadt replikációs villa esetén még nem ismert részleteiben. Az Srs2-nek több lehetséges funkcionális humán homológja van. Az FBH1 és RECQ5 fehérjék képesek a Rad51 filamentumokat szétszedni, az RTEL1 helikáz aktivitása révén a D-hurok szétszerelésében játszik szerepet^{66,67,68,69,70}. A PARI fehérje (PCNA-Associated Recombination Inhibitor) anti-rekombináz hatását a közelmúltban leírták, ugyanakkor a SUMO-PCNA-vel való kapcsolata még nem tisztázott, bár kimutatták, hogy a PARI képes kölcsönhatásba lépni vele⁷¹.



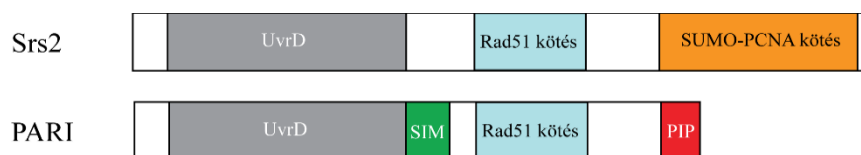
8. ábra: Az élesztő Srs2 funkcionális homológjai humán sejtekben

Az FBH1 és RECQ5 fehérjék a Rad51 filamentumok, az RTEL1 a D-hurok szétszerelésében játszik szerepet. A PARI fehérje kölcsönhat a SUMO-PCNA-vel, és gátolja a rekombináció-függő folyamatokat, azonban ennek pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert.

3.3.3.1. A PARI fehérje jellemzése

A PARI-t először DNS/RNS-kötő fehérjeként írták le. Később a bázis kivágó hibajavításban betöltött szerepében jellemezték, mint a PARP-1 aktivátora. (PARPBP, PARP1- binding protein)⁷². Mára kiderült, hogy ezen funkciójától lényegesen fontosabb a rekombinációs folyamatok szabályozásában betöltött szerepe. A 65 kDa-os fehérje doménszerkezete nagyon hasonlít az Srs2 fehérjéhez. Rendelkezik egy *UvrD*(-szerű) doménnel. Ez a domén felelős az Srs2-ben az ATP-függő DNS helikáz funkcióért. A PARI fehérje esetében azonban ez a domén nem tartalmaz WalkerA (ATP-kötő) és Walker B (Mg^{2+} -kötő) motívumokat, melyek az ATP-kötésért és -hidrolízisért felelősek. Emiatt ATP hidrolízisre nem képes, ezért helikáz aktivitása nagyon gyenge. Található benne egy *SIM* régió (*SUMO interacting motif*) is, ami a SUMO fehérje kötéséért felelős. 411-487 aminosavai között *Rad51* kötésért felelős régió helyezkedik el. A fehérjében megtalálható egy *PIP* domén (*PCNA-interacting peptide*), ami a PCNA-hez való kötődéséhez szükséges (8. ábra)^{71,73}.

A PARI-hiányos sejtek megnövekedett érzékenységet mutatnak különböző DNS-károsító ágensekre, mint a mitomicin C, hidroxiurea, vagy ciszplatin. Ez arra enged következtetni, hogy fontos szerepet tölt be a genom stabilitásának megőrzésében. A PARI szerepét hangsúlyozza az is, hogy egyes tumorokban - mell-, vastagbél-, máj- és tüdőrák, valamint több szarkóma típusban is - megnövekedett PARI fehérje szintet lehet kimutatni^{71,74,75,76}.



9. ábra: A PARI és Srs2 fehérjék doménszerkezete

A két fehérje doménszerkezete nagyon hasonló, a PARI UvrD helikáz doménje azonban inaktív. Mindkét fehérje rendelkezik Rad51-, illetve SUMO-PCNA-kötést biztosító motívumokkal.

4. CÉLKITŰZÉS

A nemkívánt rekombinációs események súlyos következményekkel járhatnak a sejtek életében: genomi átrendeződésekhez, rák kialakulásához vezethetnek. A rekombináció tehát nagyon szigorú szabályozás alatt áll a sejtekben, melyet számos fehérje összehangolt működése tesz lehetővé. Élesztő modellrendszerben kimutatták, hogy az Srs2 gátolja a rekombináció-függő folyamatokat elakadt replikációs villa esetén, ugyanis egyrészt kölcsönhat a Rad51 fehérjével, és helikáz aktivitásának köszönhetően szétszereli a preszinaptikus filamentumot, vagy a D-hurkot; másrészt képes meggátolni a D-hurok meghosszabbítását. Ez utóbbi funkciója független a helikáz aktivitásától vagy a Rad51-interakciójától, viszont függ a SUMO-PCNA-tól. Humán sejtekben azonban nagyon keveset tudunk arról, hogyan is zajlik a rekombináció-függő folyamatok szabályozása elakadt replikációs villa esetén. Bár az Srs2-nek több funkcionális humán homológja is ismert, a SUMO-PCNA-vel való együttműködésüket részleteiben még nem vizsgálták. A PARI (PCNA-Associated Recombination Inhibitor) fehérje anti-rekombináz funkciója, illetve SUMO-PCNA-kötése ismert volt korábban, ezért felvetődött, hogy a két fehérje együttműködik a rekombináció-függő folyamatok szabályozása során.

Kutatásunk fő célkitűzése volt, hogy mélyebb betekintést adjunk a PARI és a SUMO-PCNA interakciójára a rekombináció-függő folyamatok szabályozásában.

Munkánk során sejtbioológiai és biokémiai módszerekkel vizsgáltuk meg a két fehérje együttműködésének szerepét a rekombináció-függő folyamatok szabályozásában. Ehhez következő kísérleteket végeztük el:

1. Túlélési kísérletekkel azt kívántuk megvizsgálni, hogy a PARI fehérje milyen kapcsolatban áll a Rad18-függő DNS-hibatolerancia útvonalakkal UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa esetén.
2. Egy, a homológ rekombinációs frekvenciát mérő riporterrendszer segítségével azt terveztük meghatározni, hogy a PARI fehérje túltermeltetése hogyan befolyásolja a sejtben zajló rekombinációs eseményeket.
3. Szintén a fent említett riporterrendszer segítségével kívántuk meghatározni, hogy a PARI egyes doménjei (helikáz, PCNA-, illetve SUMO-interakciós motívumai) miként befolyásolják a rekombinációs eseményeket a sejtekben.

4. Immunfestés és mikroszkópos analízis segítségével terveztük nyomon követni, hogy hogyan befolyásolják a PARI fehérje lokalizációját a PCNA- és SUMO-interakciós doménjeiben létrehozott pontmutációk, illetve mi történik, ha olyan PCNA van jelen a sejtekben, amely nem képes poszttranszlációs módosulásra a 164. lizinjén.
5. Kromoszómaaberrációs vizsgálatokkal terveztük meghatározni, mi történik a kromoszómákkal, ha kontrollálatlanul sok PARI fehérje van jelen a sejtekben.
6. Egy biokémiai riporterrendszer segítségével azt a pontos molekuláris mechanizmust kívántuk modellezni, amely a rekombinációs események egyik kulcslépése, az úgynevezett D-hurok meghosszabbítása. Meg szeretnénk volna vizsgálni, milyen szerepe van ebben a PARI fehérjének, PCNA- és SUMO-interakciós motívumai hogyan befolyásolják ezt, és milyen szabályozó szerepe van ebben a PCNA illetve a SUMOilált PCNA fehérjének.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A kísérletek során felhasznált tápoldatok

- Tápoldat humán sejteknek: 1×DMEM (Sigma, D6429), 10% FBS (Gibco, A4766801)
- Transzfekcióhoz használt tápoldat: OptiMEM (Gibco, 31985062)
- Tápoldat SF9 sejteknek: Express Five (Gibco, 10486025)
- LB tápfolyadék: Tripton (10 g/l), NaCl (10 g/l), élesztőkivonat (5 g/l), pH 7.5
- LB táptalaj: LB tápoldat, Bacto agar (1,5%)

5.2. A kísérletek során felhasznált antibiotikumok (végkoncentráció)

- Ampicillin: 100 µg/ml
- Kanamicin: 10 mg/ml
- Spektinomycin: 100 µg/ml
- 1% antibiotikum mix: 1g streptomycin, 10⁶ NE penicillin / 100ml oldatban
- Neomicin (G418 szulfát): 300 µg/ml
- Puromycin: 1 µg/ml (HeLa sejtek), és 0,4 µg/ml (HEK293 sejteken)

5.3. A kísérletek során felhasznált ellenanyagok

A kísérletek során felhasznált ellenanyagokat a 2. táblázat foglalja össze:

Antigén	Származási organizmus	Jelölés	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás mértéke
Flag	egér	HRP	Sigma	A8592	5000×
PCNA	egér	HRP	Santa cruz	sc-56	3000×
PCNA	egér		Santa cruz	sc-56	300×
egér	birka	Cy3	Sigma	C2181	1000×
Flag	nyúl		Sigma	F7425	200×
Flag	birka	Cy3	Sigma	A9594	500×
HA	nyúl		Cell Signaling	C29F4	200×
HA	patkány	HRP	Roche	12013819001	5000×
nyúl	kecske	Alexa Fluor 488	Abcam	ab150077	500×

2. táblázat: A kísérletek során felhasznált ellenanyagok

5.4. A kísérletek során felhasznált oldatok

- PBS oldat: 10×puffer: 80 g NaCl, 2 g KCl, 6,1 g Na₂HPO₄ / 1l
- SDS puffer: 10×puffer: 30,2 g Tris, 144 g glicin, 10 g SDS/ 1l
- Transzfer puffer: 10×puffer: 24, g Tris, 111,6 g glicin/ 1l, a blottoláshoz 10× hígított oldat
- TBS puffer: 10×puffer: 1500 mM NaCl, 200 mM Tris HCl (pH 7,5)
- TBS TWEEN oldat: 10×puffer: 10×TBS puffer, 0,05% TWEEN20
- 0.25% tripszin EDTA oldat (Sigma, T4049)

5.5. PCR primerek és egyéb oligonukleotidok

- Kontroll csendesítő plazmid esetén a következő oligonukleotidokat használtuk:
GATCCCCCTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTGGAAA
AGCTTTTCCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGGAGAAGGG
- A PARI shRNS alapú csendesítését biztosító plazmid esetén a következő oligonukleotidokat használtuk:
GATCTAGGACACATGTAAAGGGATTGTCTACAAGAGATAGACAATCCCTTTACATGTGTCTTTTTTA
AGCTTAAAAAAGGACACATGTAAAGGGATTGTCTATCTTGTAGACAATCCCTTTACATGTGTCCTA
- A RAD18 shRNS alapú csendesítését biztosító plazmid esetén a következő oligonukleotidokat használtuk:
GATCTGTTCCAGTTCAGACATCATAATTCAAGAGATTATGATGTCTGAACTGGAACCTTTTTTA
AGCTTAAAAAAGTTCAGTTCAGACATCATAATCTCTTGAATTATGATGTCTGAACTGGAACA
- A PCNA shRNS alapú csendesítését biztosító plazmid esetén a következő oligonukleotidokat használtuk:
AGCTTCGTATATGCCGAGATCTCATTCAAGAGATGAGATCTCGGCATATACGTTTTTTG
AATTCAAAAAACGTATATGCCGAGATCTCATCTTGAATGAGATCTCGGCATATACGA
- Teljes hosszúságú PARI amplifikálásához a következő oligonukleotidokat használtuk:
CTCAGTTTTTTAGACTATAACGTACGCGGCCGCTCG
CGAGCGGCCGCGTACGTTATAGTCTAAAAAACTGAG
- PIP mutáns mutagén PCR esetén a következő oligonukleotidokat használtuk:
GGCAAAGTTAACTCAGGCTGCTAGACTATTGCCAACTTTC
GAAAGTTGGCAATAGTCTAGCAGCCTGAGTTAACTTTGCC
- SIM mutáns mutagén PCR esetén a következő oligonukleotidokat használtuk:
GATACTGTGAAAGCCCCAGCAGCTCCTTTGGACGAAGAAGC
GCTTCTTCGTCCAAAGGAGCTGCTGGGGCTTTCACAGTATC
- D1 oligonukleotid
AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC
AGCGATCTGTCTATTT

5.6. A kísérletek során felhasznált plazmidok

A kísérletek során felhasznált plazmidokat a 3. táblázat foglalja össze:

Gén	Vektor	Leírás
	pMAL2cX	Addgene
	pDONR222	Addgene
	pRK2F	Addgene
	pRK2H	Addgene
	pENTRY1A	Addgene
	pFP/GT-neo	⁷⁷
Myc-DKK-PARI	pLenti-C-Myc-DDK	Origene, RC220356L1
PARI ₂₈₆₋₅₇₉	pDONR	
PARI ₃₃₃₋₅₇₉	pENTRY	
	pBluescript SK(-)	Addgene
Kontroll shRNS	pFP/GT-neo	Kontroll csendesítő plazmid
PARI shRNS	pFP/GT-neo	PARI shRNS alapú csendesítését biztosító plazmid
RAD18 shRNS	pFP/GT-neo	RAD18 shRNS alapú csendesítését biztosító plazmid
PCNA shRNS	pFP/GT-neo	PCNA shRNS alapú csendesítését biztosító plazmid
Frog Prince transzpozáz	pFV-FP	Frog Prince transzpozáz expresszióját biztosító plazmid
Flag-PARI	pRK2F	Flag-PARI teljes hosszúságú humán expressziós plazmid
HA-PARI	pRK2H	HA-PARI teljes hosszúságú humán expressziós plazmid
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉	pRK2F	humán expressziós plazmid
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉ PIP pontmutáns	pRK2F	humán expressziós plazmid
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉ SIM pontmutáns	pRK2F	humán expressziós plazmid
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉ PIP/SIM	pRK2F	humán expressziós plazmid
Flag-PCNA	pRK2F	humán expressziós plazmid
Flag-PCNA K164R pontmutáns	pRK2F	humán expressziós plazmid
Flag-Rad18 shRNS rezisztens	pRK2F	humán expressziós plazmid
I-SceI endonukleáz	pCMV	humán expressziós plazmid
His-Flag-PARI	pVL1392	bakulovírus expressziós plazmid
BakPAK6 bakulovírus DNS		Clontech
His-Flag-PARI		bakulovírus transzfer vektor
MBP-PARI ₃₃₃₋₅₇₉	pMAL2cX	<i>E. coli</i> expressziós plazmid
MBP-PARI ₃₃₃₋₅₇₉ PIP pontmutáns	pMAL2cX	<i>E. coli</i> expressziós plazmid
MBP-PARI ₃₃₃₋₅₇₉ SIM pontmutáns	pMAL2cX	<i>E. coli</i> expressziós plazmid
MBP-PARI ₃₃₃₋₅₇₉ PIP/SIM pontmutáns	pMAL2cX	<i>E. coli</i> expressziós plazmid

3. táblázat: A kísérletek során felhasznált plazmidok

5.7. A kísérletek során használt sejtvonalak

- HEK293 (ATCC)
- Az shRNS-eket stabilan expresszáló HEK293 sejtvonalakat 300 µg/ml Neomicin (G418 szulfát) tartalmú DMEM tápoldatban növesztettük.
- A GFP-t konstitutívan expresszáló HeLa sejtvonalat 1 µg/ml Puromicin tartalmú DMEM tápoldatban növesztettük.
- A homológ rekombinációt mérő riporterrendszerben (DR-GFP) alkalmazott HEK293 sejtvonalat 0,4 µg/ml Puromicin tartalmú DMEM tápoldatban növesztettük
- SF9 High Five (rovarsejtvonal teljes hosszúságú PARI fehérje tisztításához)

5.8. A kísérletek során használt baktériumtörzsek

- DH5α („destination” vektort tartalmazó plazmidok) (ATCC)
- DB3.1 (pDONR és „entry” vektort tartalmazó plazmidok) (ATCC)
- BL21 RIPL (MBP-PARI fehérje termeltetéséhez) (ATCC)

5.9. A kísérletek során alkalmazott módszerek

5.9.1. Restriktációs endonukleázzal történő emésztés

Restriktációs endonukleázzal történő emésztéskor a DNS 1 µg-jához 1 egység enzimet használtunk (Fermentas). 5 féle 10X puffer közül választottuk ki az enzim számára megfelelőt. Az reakció 2 órán keresztül valósult meg 37°C-on. Ezt követően a reakcióelegyhez 5X STOP puffert adtunk, majd agaróz gélen futtattuk meg. A kívánt fragmenteket gélből izoláltuk.

5.9.2. A klónozások során alkalmazott PCR

A PCR a következő komponenseket tartalmazta 10-10 pmol primer, 2,5 µl Pfu puffer+MgSO₄10× (Fermentas, F553S), 0,1 mM dNTP keverék, 50 ng templát plazmid. 1,25 µl Pfu polimeráz (Fermentas, F553S), 18,5 µl MQ víz. Az amplifikáláshoz a következő PCR programot használtuk: 1: 94°C, 3 perc, 2: 94°C-30 mp, 3: 55°C-30 mp, 4: 68°C-15 perc, 5: 68°C-5perc, 6: 4°C-∞ (2-4 20 ciklus).

Mutagén PCR esetén a reakciót követően 1 µl DpnI enzimet adtunk a reakcióelegyhez, hogy eltávolítsuk a metilált eredeti DNS-szálat.

5.9.3. DNS fragmentumok izolálása agaróz gélből és PCR termék tisztítása

A PCR termékek tisztításához a Qiagen cégtől származó PCR fragment/gél izoláló kitet használtuk a hozzá tartozó protokollal (28506).

5.9.4. Ligálás

A ligálás során T4 DNS ligáz enzimet és a hozzá tartozó puffert (Thermo Fisher, EL0012, B69) használtuk. A reakció szobahőmérsékleten 4 órán keresztül valósult meg. A DNS-fragmenteket 1:1 arányban alkalmaztuk.

5.9.5. LR reakció

A klónozások során az úgynevezett „Gateway” rendszert alkalmaztuk, amely lényegesen megrövidíti és egyszerűsíti a klónozást, ugyanis elegendő a célgénünket beépíteni egy „entry” vagy „pDONR” vektorba, majd ez egy lépésben egy úgynevezett LR klonáz enzim segítségével, rekombinációval bejuttathatunk egy általunk választott expressziós (humán, bakteriális, stb.) úgynevezett „destination” plazmidba. Ennek a módszernek a fő lépése az úgynevezett LR reakció, amely során egy LR klonáz nevű rekombináz enzim „kazettacserét” végez két „kompatibilis” plazmid között. Az egyik plazmid attL (attachement left), a másik attR (attachement right) rekombinációs helyeket tartalmaz. Ezen szakaszok között valósul meg a rekombináció.

Az LR reakcióhoz a következő komponenseket mértük össze: 0,6 µl (100 ng) „entry” vagy „pDONR” vektor, 0,6 µl (100 ng) „destination” vektor, 0,4 µl LR klonáz puffer (Thermo Fisher, 12538120), 0,4 µl puffer TE pH 8,0 (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA), 0,2 µl LR klonáz (Thermo Fisher, 12538120). Ezt a reakcióelegyet szobahőmérsékleten inkubáltuk 8 órán keresztül.

5.9.6. PARI csendesítő és expressziós vektorok klónozása

Frog Prince alapú csendesítés esetén pFP/GT-neo vektor BglII, HindII helyeire klónoztuk a megfelelő shRNS-t kódoló hibridizált oligonukleotidokat. A teljes hosszúságú PARI expressziós plazmid készítésekor Myc-DKK-PARI cDNS-t tartalmazó vektorból PCR segítségével pENRTY1A vektor SalI, NotI helyeire klónoztuk a PARI cDNS-ét, majd LR reakció segítségével pRK2F és pRK2H vektorba juttatuk. A PARI C-terminális fragmentet tartalmazó expressziós plazmidok készítésekor a PARI₂₈₆₋₅₇₉ pDONR és PARI₃₃₃₋₅₇₉ pENTRY vektorokból a PARI fragmenteket kódoló szakaszt LR reakció segítségével humán expresszióhoz pRK2F, *E. coli* expresszióhoz pMAL2cX vektorba juttatuk.

5.9.7. Plazmidtisztítás baktériumból

Az *E. coli*-ból történő plazmid tisztításhoz a Qiagen cégtől származó Midi Prep kitet, és az ahhoz tartozó protokollt használtuk (27104).

5.9.8. Baktérium transzformálása

A kompetens baktériumsejteket jégen olvasztottuk fel, majd hozzáadtuk a plazmid DNS-t (100 ng). Jégen inkubáltuk 20 percig, melyet hősokk követett 1 percig 42°C-on. Ezután 2 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a sejtekhez hozzáadtunk 1 ml LB tápoldatot, és 1 órán át 37°C-on inkubáltuk. Ezután a sejteket centrifugálással üleptítettük 3 percig 4000 rpm-el. A felülúszó eltávolítása után a baktériumokat antibiotikummal kiegészített LB táplemezre szélesztettük, és éjszakán át 37°C-on növesztettük.

5.9.9. Humán sejt kultúrák transzfektálása Lipofectamine 2000 reagenssel

A transzfekció előtt 24 órával a sejteket 6 lyukú lemezre helyeztük. A transzfekciót Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668019) reagenssel végeztük a gyártó által javasolt protokoll szerint.

5.9.10. A stabil sejtvonalak készítése

HEK293 sejteket a géncsendesítéshez szükséges plazmidokkal (Kontroll shRNS, Rad18 shRNS, valamint PARI shRNS expresszióját biztosító plazmidokat, valamint a Frog Prince transzpozáz expresszióját biztosító plazmidot) transzfektáltuk Lipofectamine 2000 reagenssel 6 lyukú lemezen. 0,2 µg transzpozázt, 1 µg shRNS-t kódoló plazmidot alkalmaztunk. A transzfektálás után 48 óra elteltével a sejteket 10% FBS, 300 µg/ml G-418 szulfát tartalmú DMEM-be helyeztük 10 cm-es Petri-csészékben. A sejteket 14 napig növesztettük, hogy a rezisztens klónok jól látható kolóniákat képezzenek. Az egyedi kolóniákat izoláltuk, majd felnövesztve egyedi sejtvonalakat hoztunk létre. A csendesítés sikerességét western blot segítségével ellenőriztük.

5.9.11. Gélelektroforézis és western blot

Kísérleteink során nátrium-dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztunk. A fehérjék kötése nitrocellulóz membránra 150 mA-rel 12 órán át 4°C-on valósult meg. A membránt 5% tejpor, 1% BSA/1X TBS TWEEN oldatban 1 órán át, majd HRP-konjugált 5% tejpor, 1% BSA/1X TBS TWEEN oldatban hígított antitesttel 1,5 órán keresztül inkubáltuk. Ha az elsődleges ellenanyag nem HRP-konjugált, akkor 2X 10 perces 1XTBS TWEEN-nel való mosás után 1 órán keresztül inkubáltuk a membránt a HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal 5% tejpor, 1% BSA/1X TBS TWEEN oldatban hígítva. Ezt követte 3X 5 perc mosást követően 1XTBS TWEEN-el, majd 2X 10 percig 1XTBS-sel. A fehérjék kimutatására megnövelt kemilumineszcencia módszert alkalmaztunk (Millipore, ECL). A detektálást Kodak Imagerrel végeztük.

5.9.12. Áramlási citométer alapú túlélési kísérlet

HEK293 sejtekből elkészített stabil sejtvonalakat megfelelő plazmidokkal transzfektáltuk Lipofectamine 2000 reagens segítségével 6 lyukú lemezen, amennyiben ez szükséges volt. A transzfektált sejteket 24 óra elteltével különböző dózisú UV-sugárzással kezeltük, majd hét napig növesztettük. Ezt követően összekevertük GFP-t stabilan expresszáló HeLa sejtekkel, 3:1 arányban (vizsgált sejtek : GFP sejtek). Ezután áramlási citométer (Guava Easy Site System) segítségével megmértük a GFP-pozitív, illetve GFP-negatív sejtek arányát.

5.9.13. Homológ rekombináció vizsgálata

A homológ rekombináció arányának mérését HEK293 sejteken végeztük egy DR-GFP nevű, korábban publikált rendszer segítségével⁷⁸. A módszer lényege, hogy a sejt vonal egy csonka GFP-t tartalmaz, amely egy távtartó régiót követve tartalmazza a GFP másik felét, előtte egy I-SceI endonukleáz felismerőhellyel. I-SceI endonukleáz alkalmazásával kettősszájú töréseket hozhatunk létre. A sejt vonal genomjában megtalálható a GFP internális (hiányzó) szakasza is, amely templátként szolgálhat a homológ rekombinációhoz. Ha homológ rekombináció segítségével helyreáll a GFP gén, kifejeződik a sejtekben, és áramlási citométerrel zöld fluoreszcenciát detektálhatunk. Ennek segítségével határozhatjuk meg, hogy a milyen arányban történt homológ rekombináció a sejt populációban. A kísérletek során a sejtek transzfekcióját 6 lyukú lemezen végeztük a megfelelő (shRNS-t, illetve az adott fehérje túltermelését biztosító) plazmidokkal Lipofectamine 2000 segítségével. 48 óra elteltével ismét transzfekciót végeztünk, ezúttal I-SceI endonukleáz expresszióját biztosító plazmiddal, illetve a csendesítő, illetve a túltermelő plazmidokkal, 3:1 arányban. A zöld fluoreszcenciát áramlási citométerrel (Guava Easy Site System) detektáltuk 72 óra múlva.

5.9.14. A sejtek immunfestése

A sejtek immunfestését 24 órával a transzfekció után végeztük fedőlemezre ültetett sejteken. 1XPBS-es mosást követően a következő kezelőoldattal kezeltük a sejteket: 10mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5mM MgCl₂, 0,5% NP-40, 1mM PMSF. A sejteket jéghideg metanollal fixáltuk 10 percig. Ezt követtek egy 5 perces mosás 0,1% Triton X-100 /1XPBS oldattal. A lemezeket 1% BSA 0,1% Triton X-100 oldattal 30 percig inkubáltuk. A sejteket az elsődleges, illetve a fluoreszcensen konjugált másodlagos ellenanyagokkal egyaránt 1 órán keresztül inkubáltuk. A két ellenanyag alkalmazása között 2X 5 percig végeztünk mosást 1% Triton X-100/1XPBS oldattal. (Flag-PCNA immunfestése esetén az elsődleges ellenanyag Cy3 konjugált volt, így nem volt szükség másodlagosra). Az ellenanyagokat 1% BSA 0,1% Triton X-100 oldatban hígítottuk. A mintákat 3X5 percig mostuk 0,1% Triton X-100/1XPBS oldattal, majd a sejtmagokat DAPI-val festettük (DAPI 1000×hígítva 25% glicerolos oldatban). A fedőlemezt a rajta lévő sejtekkel együtt a tárgylemezen rögzítettük. A mintákat Olympus FV100 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

5.9.15. Kromoszómaaberrációs vizsgálatok

A kísérlet során a sejteket 2 órán keresztül 0,5 µg/ml demekolcin (Sigma, D7385-10MG) tartalmú tápoldatban növesztettük. 1X PBS-sel történő mosást követően 75 mM KCl oldatban 10 percig inkubáltuk. Ezt metanolos fixálás követte 2 percig, majd metanol:ecetsav (3:1) kezelés 10 percig. A fixált mintákat üveglemezekre cseppentve szárítottuk, majd 0,1 µg/ml acridine-orange (Sigma) oldat segítségével megfestettük, és Leica konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

5.9.16. A biokémiai kísérletekhez szükséges fehérjék tisztítása

5.9.16.1. A teljes hosszúságú PARI fehérje tisztítása

A teljes hosszúságú PARI fehérje tisztításához His-Flag-PARI bakulovírus expressziós rendszert alkalmaztunk. High Five Sf9 sejteket megfertőztük a megfelelő bakulovírusal, és 28°C-on 40 órát inkubáltuk, majd centrifugálással összegyűjtöttük. A lízishez a következő puffert használtuk: 25 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 300 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0,2% Triton X-100. A szonikálást követően 20 000 g sebességgel 4°C-on 30 percig centrifugálással üleptítettük a sejtörmeléket. A lizátumot 0,45 µm-es szűrőn szűrtük, majd egy TALON tartalmú poli-prep kromatográfiás oszlopra vittük fel (Bio Rad, PT3755-2). Az oszlopot 4X mostuk 10 ml 10 mM imidazol tartalmú lízis pufferrel. Az elúció 200 mM imidazol tartalmú lízis pufferrel történt. A dialízis szintén lízis pufferrel történt. A fehérjét tartalmazó oldatot ezután Anti-Flag M2 (Sigma, A2220) tartalmú poli-prep kromatográfiás oszlopra vittük fel. A mosást 3X végeztük el 10 ml lízis pufferrel. Az elúció 6X 0,5 ml 200 µg/ml 3X Flag peptidet tartalmazó lízis pufferrel valósult meg.

5.9.16.2. Az N-terminális deléciót tartalmazó PARI₃₃₃₋₅₇₉ fehérjék tisztítása

A vad típusú, illetve a mutáns N-terminális deléciót tartalmazó MBP-PARI expressziója *E. coli* BL21 RIPL sejtekben történt. Az LB tápoldathoz 100 µg/ml Ampicillin antibiotikumot adtunk. A sejtek növesztése a logaritmusos fázisig történt 11°C-on. Ekkor adtunk hozzá 0,2 mM IPTG-t. 24 órát inkubáltuk. 10 g centrifugálással összegyűjtött sejthez 50 ml lízis puffert adtunk (50 mM Tris-HCl, 10% szukróz (w/v), 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% NP40, 500 mM KCl pH 7,5.) A sejteket szonikálással tártuk fel. Ezt követte egy centrifugálási lépés 20000 g, 4°C-on 60 percig.

A felülúszóban lévő fehérjéket amilóz mátrix tartalmú affinitás kromatográfiával tisztítottuk (NEB, E8021S). Az oszlopot előzőleg T pufferrel ekvibráltuk. (25 mM Tris–Cl, 10% (v/v) glicerol, 5 mM EDTA, pH 7,5) kiegészítve 500 mM KCl-dal. 2 óra inkubációt követően a fehérjéket 6X 2 ml 10 mM maltózzal eluáltuk 150 mM KCl-ot tartalmazó T pufferrel. A frakciókat összegyűjtöttük, majd hígítottuk 5 ml T pufferrel. Ezt Mono S oszlopra (GE Healthcare, GE17-5180-01) vittük fel, melyet előzőleg 150 mM KCl tartalmú T pufferrel ekvibráltunk. Az MBP-PARI fragmenteket 20 ml 100-500 mM KCl gradienssel eluáltuk T pufferben. A frakciókat Vivaspin koncentrátorral töményítettük (Merck, Z614009-25EA).

5.9.17. A PCNA *in vitro* SUMOilációja

A PCNA fehérje *in vitro* SUMOilálását a következő pufferben végeztük: 40 mM Tris–HCl pH 7,5, 8 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, 10% glicerol, 100 µM ATP). A GST-PCNA-t Glutation Sepharose gyöngyökhöz (GE Healthcare, 17-0756-01) kötöttük. Ehhez adtunk 10 µg Sae1/Sae2, 30 µg Ubc9, 600 µg Flag-SUMO1, 1 µg RFC fehérjéket és 50 µg DNS-t. 1 órát inkubáltuk 37 °C-on. A reakció végén az enzimeket T+100 pufferrel mostuk ki (40 mM TrisHCl pH 7,5, 10% glicerol, 0,01% NP40, 1,5 mM EDTA, 7,15 mM béta-merkaptotanol, 100 mM NaCl). A SUMOilált PCNA-t PreScission proteázzal eluáltuk T+100 pufferben 3 óra inkubációval. Az eluált fehérjéket anti-Flag gyöngyökre (Sigma, A2220) kötöttük, majd T+100 pufferrel mostuk. A Flag-SUMO-PCNA-t Flag peptiddel eluáltuk.

5.9.18. A D-hurok meghosszabbítását vizsgáló *in vitro* rendszer

A kísérlet során jelöletlen vagy radioaktívan jelölt D1 oligonukleotidokat használtunk, attól függően, hogy a kísérlet végén mit szeretnénk volna detektálni. Ebből 3 µM-t 5 percig 37°C-on inkubáltuk 1 µM Rad51 fehérjével a következő pufferben, 10 µl végtérfogatban: 35 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM ATP, 1,25 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT és egy ATP-regeneráló rendszerrel, amely 20 mM kreatin-foszfátot és 20 µg/ml kreatin kinázt tartalmazott. Ekkor jött létre a Rad51-filamentum. Ezt követően 150 nM Rad54 fehérjét adtunk a reakcióhoz és 3 percig 25 °C-on inkubáltuk. A reakciót a pBluescript SK (-) hozzáadása (50 µM) indította el. 5 percig 25°C-on inkubáltuk, majd jégen megállítottuk a reakciót.

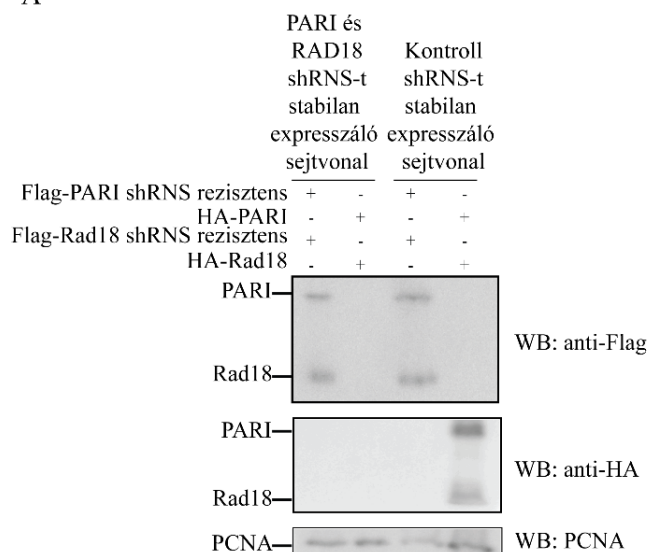
Ezt követően RPA (660 nM), PCNA (30 nM), RFC (10 nM) és Polδ (10 nM) fehérjéket adtunk hozzá a következő pufferben: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 150 mM KCl, 40 µg/ml BSA, 8 mM MgCl₂, 5% (v/v) glicerol, 0,5 mM ATP és 100 µM dGTP és dCTP keverékével 30 µl végtérfogatban. Ezt 5 perc inkubáció követte 30 °C-on. A reakciót jéggel való hűtéssel állítottuk le, majd PARI fehérjét adtunk hozzá. Ezt 2 perc inkubáció követte 37 °C-on. A DNS szintézis dTTP és dATP (100 µM) hozzáadása után kezdődött el. Amennyiben a reakció detektálásához D1 oligonukleotidot használtunk, 100 µM jelöletlen dATP-t használtunk. Amikor dATP beépülést vizsgáltunk, 0.375 µCi [³²P] dATP-t adtunk a reakcióhoz. Ezt 4 perc inkubáció követte 37 °C-on. A reakciókat 0.5% nátrium-dodecil szulfáttal és 0.5 mg/ml proteináz K-val állítottuk meg 37 °C-on, 10 percig történő inkubálással. Ezt követte az agaróz gélen történő elektroforézis (0,8 % w/v). A gél DE81-es papíron szárítottuk, majd Fuji FLA 9000 PhosphorImager segítségével detektáltuk a jelet. A kvantitálást Multi Gauge (Fuji) szoftverrel végeztük.

6. EREDMÉNYEK

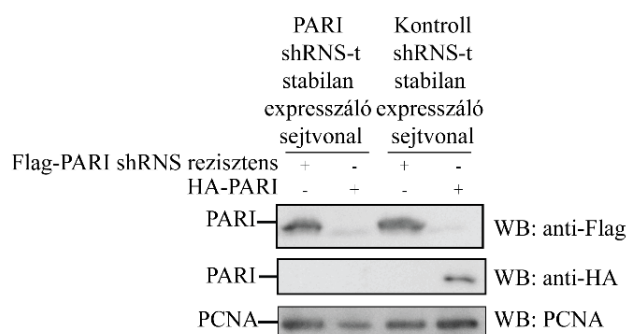
6.1. A PARI fehérje részt vesz az elakadt replikációs villák menekítésében

Munkánk során azt vizsgáltuk meg először, hogy a PARI fehérje részt vesz-e az elakadt replikációs villa menekítésében. Ehhez segítséget jelentettek a korábban élesztőben végzett vizsgálatok, melyek kimutatták, hogy az *SRS2* gén deléciója szuppresszálta a *RAD18*-deléciós sejtek UV-érzékenységét. Ennek az az oka, hogy amennyiben az UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa menekítésében nem a Rad18-függő útvonalak vesznek részt, a rekombináció-függő folyamat veszi át a szerepét. Ha az Srs2 fehérje jelen van a sejtekben, a rekombináció gátolt, így a sejtek nagyfokú érzékenységet mutatnak UV-sugárzással szemben. Ha az Srs2 nincs jelen a sejtekben, a replikációs villa menekítése megvalósulhat rekombináció-függő módon, így a sejtek UV-érzékenysége csökken. Hasonló kísérleti rendszerben vizsgáltuk meg, hogy mi történik humán sejtekben. Ehhez HEK293 sejtekben stabilan csendesített sejtvonalatokat hoztunk létre. Ezek a sejtek folyamatosan termelték a PARI, a Rad18 vagy mindkettő shRNS-ét, ugyanis egy Frog Prince transzpozáz segítségével a genomjukba épülve tartalmazták a megfelelő shRNS-t kódoló szakaszt és egy Neomicin rezisztenciáért felelős gént. A csendesítést western blot segítségével ellenőriztük úgy, hogy a stabil sejtvonalatokat, illetve egy kontroll sejtvonalat transzfektáltunk vad típusú, illetve úgynevezett shRNS rezisztens fehérjék expresszióját biztosító plazmidokkal. Ez utóbbiak olyan mutációt tartalmaztak, melynek köszönhetően az shRNS nem volt képes az mRNS-ükhöz hibidizálni, így az RNS interferencia nem valósulhatott meg. A kontroll sejtvonaltban mindkét expressziós plazmid használata után kimutatható volt a fehérjék jelenléte, a csendesített sejtvonalatokban viszont csak az shRNS rezisztenseket mutattuk ki western blot segítségével. Ez arra utal, hogy a csendesítés valóban működött a sejtekben (10. ábra).

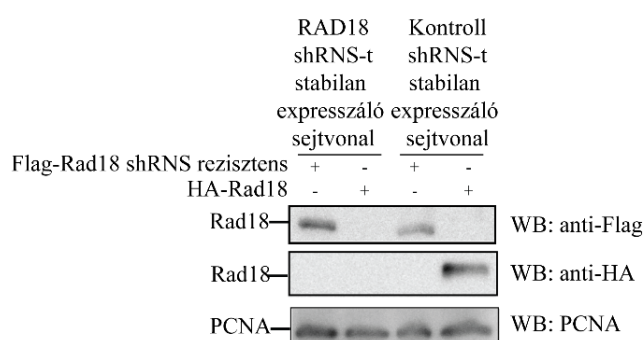
A



B



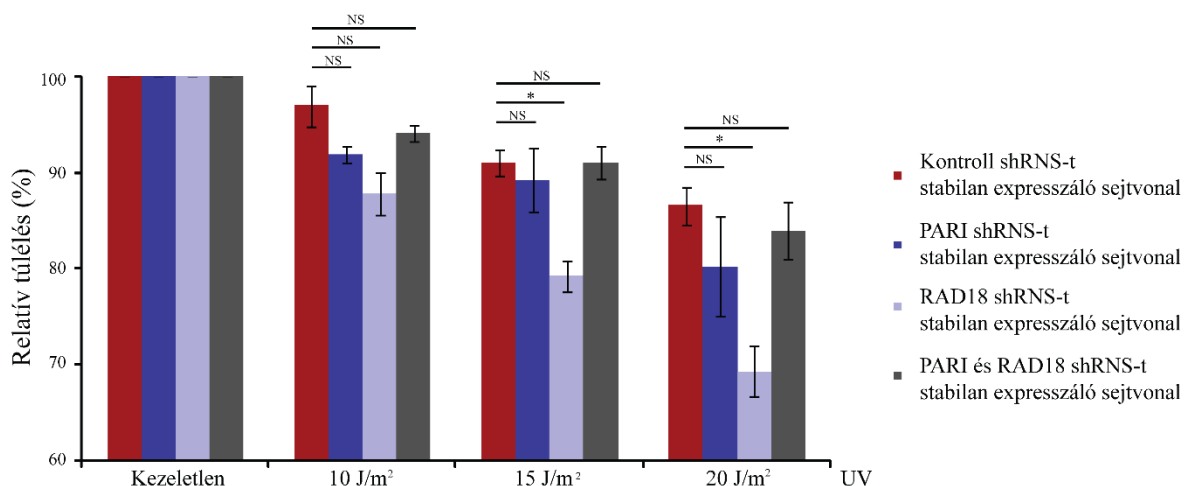
C



10. ábra: A stabilan csendesített sejtvonalak ellenőrzése

Az egyes és kettős stabilan csendesített sejtvonalakat western blot segítségével ellenőriztük. A sejteket transzfektáltuk vad típusú, illetve shRNS rezisztens fehérjék expresszióját biztosító plazmidokkal. A kontroll sejtvonalakban minkét fehérjét detektáltuk western blot segítségével, a csendesített sejtvonalakban csak a shRNS-rezisztens fehérjék fejeződtek ki. Belső kontrollként anti-PCNA ellenanyagot használtunk az endogén PCNA fehérje kimutatására. (A) RAD18- és PARI shRNS-t stabilan expresszáló sejtvonal ellenőrzése. Anti-Flag ellenanyaggal a Flag-jelöléssel ellátott shRNS rezisztens, anti HA-ellenanyaggal a vad típusú HA-jelöléssel ellátott fehérjéket mutattuk ki. (Rad18 és PARI) (B) PARI shRNS-t stabilan expresszáló sejtvonal ellenőrzése. Anti-Flag ellenanyaggal a Flag-jelöléssel ellátott shRNS rezisztens, anti HA-ellenanyaggal a vad típusú fehérjéket mutattuk ki. (PARI) (C) RAD18 shRNS-t stabilan expresszáló sejtvonal ellenőrzése. Anti-Flag ellenanyaggal a Flag-jelöléssel ellátott shRNS rezisztens, anti HA-ellenanyaggal a vad típusú fehérjéket mutattuk ki. (Rad18)

Ezt követően megvizsgáltuk a stabilan csendesített sejtvonalak túlélését UV-sugárzást követően. Ehhez áramlási citométer alapú túlélési kísérleteket végeztünk, amely során a vizsgálni kívánt sejteket egy GFP-t stabilan expresszáló sejtvonallal kevertük össze, így a GFP+ és – sejtek arányából következtethetünk a túlélésre. Eredményeink alapján alacsony dózisú UV-sugárzás esetén nem kaptunk szignifikáns eredményt, 15, illetve 20 J/m² esetén azonban a PARI csendesítés esetében nem, de Rad18 csendesítéskor szignifikáns mértékben nőtt a sejtek érzékenysége UV-sugárzással szemben. A kettős csendesített sejtvonalon viszont a PARI - az élesztő *SRS2*-höz hasonlóan - szuppresszálta a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységét. Ennek tehát az lehet a magyarázata, hogy a PARI csendesítése esetén a rekombináció-függő út vonal nem gátolt, így az szabadon működhet az elakadt replikációs villa menekítésében, a Rad18 fehérje hiányában (11. ábra).

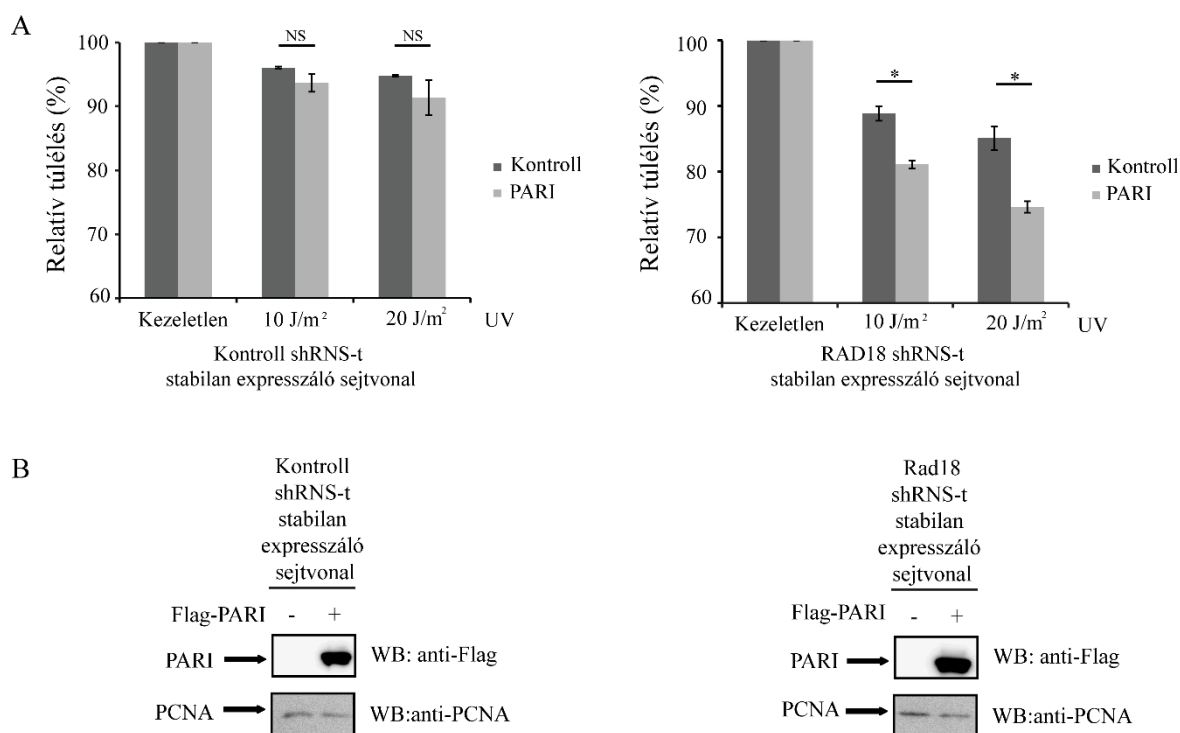


11. ábra: A PARI csendesítése szuppresszálta a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységét

A stabilan csendesített sejtvonalak UV-érzékenységét áramlási citométer alapú túlélési kísérlet segítségével vizsgáltuk. A mérési eredményeket minden sejtvonala esetében a saját kezeletlen kontrolljára normalizáltuk, így ábrázoltuk százalékosan a relatív túlélést. Minden mérés esetében 20 000 sejtet mértünk áramlási citométer segítségével, 3 párhuzamos mintával. A grafikon három független kísérlet eredményét mutatja be. A hibaszávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle t próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$

Megvizsgáltuk azt is, hogy mi történik, ha a RAD18-csendesített sejtekben túltermeltetjük a PARI fehérjét. Ehhez kontroll, illetve RAD18 shRNS-t stabilan kifejező HEK293 sejtvonalatokat alkalmaztunk, amelyekben Flag-PARI-t tranziensen termeltettük, majd megvizsgáltuk a sejtek túlélését UV-sugárzást követően, áramlási citométer alapú túlélési kísérlettel. Ebben az esetben is összekevertük a vizsgálni kívánt sejteket GFP-t stabilan termelő sejtvonallal, és a GFP+ és – sejtek arányából következtettük a sejtek túlélésére.

A kontroll sejtvonalban a PARI fehérje túltermelése nem befolyásolta szignifikánsan a sejtek túlélését UV-sugárzással szemben, a RAD18-csendesített sejtekben azonban alacsony és magas UV-sugárzást követően is szignifikánsan nőtt a sejtek UV-érzékenysége, ha túltermeltettük a PARI fehérjét. Ennek a magyarázata az lehet, hogy a PARI fehérje gátolhatja a rekombináció-függő folyamatokat a sejtekben, így az UV-sugárzás okozta károsodás javítása sem Rad18-, sem rekombináció-függő módon nem valósulhat meg. A minták egy részéből sejtlizátumot készítettünk, és a Flag-PARI fehérje túltermelését a sejtekben western blot analízissel igazoltuk (12. ábra).

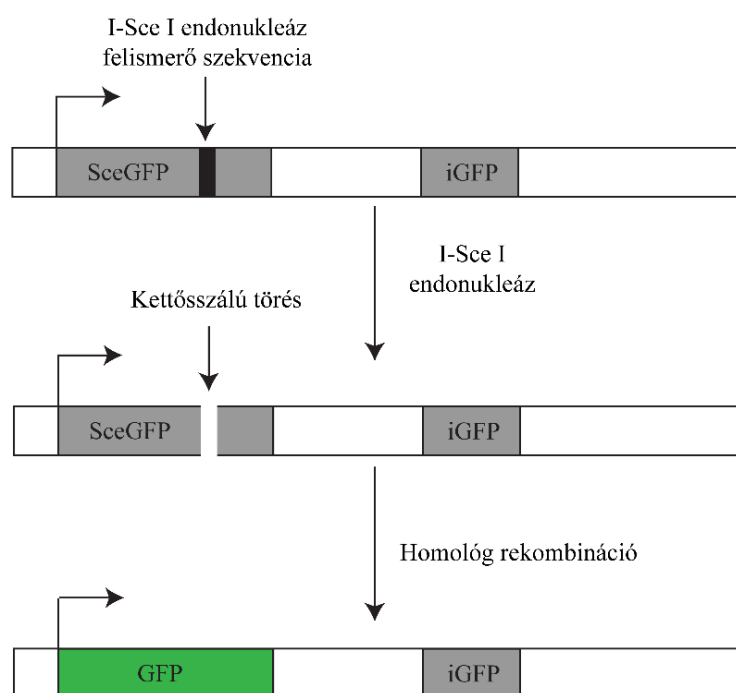


12. ábra: A PARI fehérje túltermelése tovább növeli a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységét

(A) A kontroll, illetve Rad18 shRNS-t stabilan termelő sejtvonalak UV-érzékenységét áramlási citométer alapú túlélési kísérlet segítségével vizsgáltuk. A mérési eredményeket minden sejtvonal esetében a saját kezeletlen kontrolljára normalizáltuk, így ábrázoltuk százalékosan a relatív túlélést. Minden mérés esetében 20 000 sejtet mértünk áramlási citométer segítségével, 3 párhuzamos mintával. A grafikon három független kísérlet eredményét mutatja be. A hibásávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle t próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ (B) A Flag-PARI fehérje jelenlétét a sejtekben western blot analízissel, anti-Flag ellenanyaggal igazoltuk. Belső kontrollként anti-PCNA ellenanyagot alkalmaztunk az endogén PCNA kimutatására.

6.2. A PARI fehérje gátolja a homológ rekombinációt *in vivo*

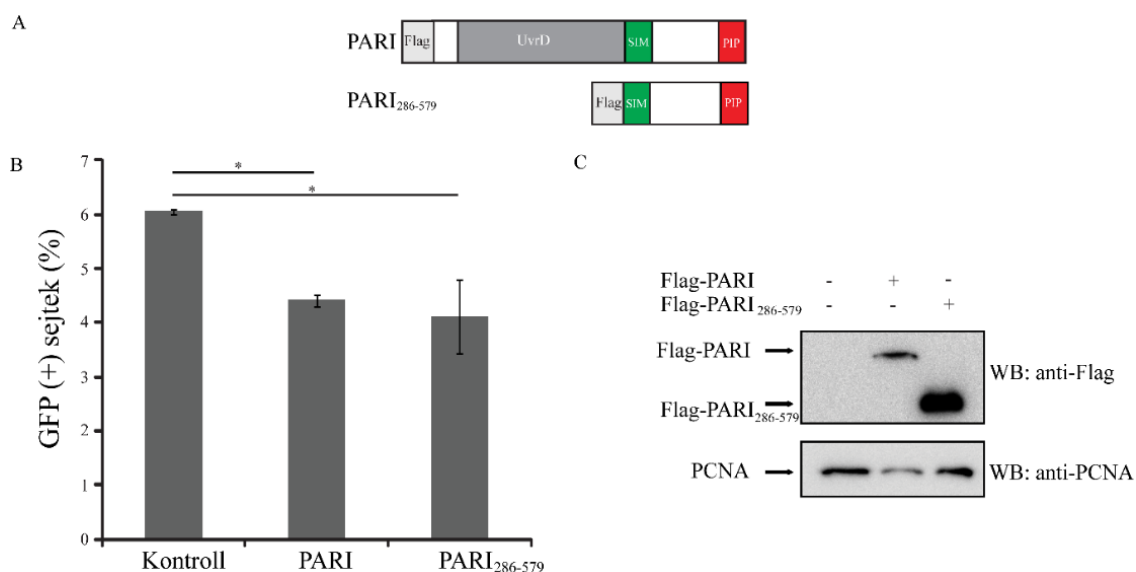
Az, hogy a PARI fehérje hiánya menekíti, túltermelése pedig növeli a RAD18-csenedesített sejtek UV-érzékenységet, arra utal, hogy az élesztő Srs2 fehérjéhez hasonlóan a homológ rekombináció negatív regulátora lehet. Ennek vizsgálatához egy korábban publikált homológ rekombinációt mérő riporterrendszert használtunk, ami a DR-GFP nevet viseli. A rendszer alapja egy sejtvonallal, amely a genomjába integráltan tartalmaz egy úgynevezett SceGFP szakaszt. Ez egy módosított GFP gén, amelynek a középső régiója hiányzik, tartalmaz viszont egy I-Sce I endonukleáz felismerőhelyet. Erről tehát funkcionális GFP nem íródik át. A sejtvonallal tartalmaz egy genomba integrált iGFP nevet is, amely a GFP egy 812 bázispáros internális régióját tartalmazza. Ez templátként szolgálhat a rekombinációs javításhoz, ha az SceGFP szakaszban kettősszálú törés jön létre az I-SceI endonukleáz aktivitása révén. Ha a GFP gén homológ rekombináció segítségével helyreáll, a sejtekben kifejeződik a GFP fehérje, így áramlási citométer segítségével zöld fluoreszcenciát detektálhatunk. Ebből következtethetünk a rekombinációs eseményekre egy adott sejtpopulációban. A rendszer működési elvét a 13. ábra szemlélteti⁷⁸.



13. ábra: A homológ rekombinációt mérő (DR-GFP) rendszer bemutatása

Az SceGFP-ről nem fejeződik ki funkcionális fehérje, mert hiányzik a GFP gén középső régiója, viszont tartalmaz egy I-SceI endonukleáz felismerőhelyet. Ha az I-SceI endonukleáz kettősszálú törést hoz létre, javítása megvalósulhat homológ rekombinációval. Ebben az esetben a javítás az iGFP régióról történik meg, a GFP gén helyreáll, és a sejtekben zöld fluoreszcenciát detektálhatunk. Ebből következtethetünk a homológ rekombinációs események számára egy adott sejtpopulációban.

Először a PARI fehérje túltermeltetésének homológ rekombinációra gyakorolt hatását vizsgáltuk meg a DR-GFP riporterrendszerben. A kísérlet során kétféle Flag-PARI expresszióját biztosító plazmidot használtunk. Az egyik a teljes hosszúságú PARI fehérjét kódolta, a másik pedig egy nagyméretű N-terminális deléciót tartalmazó (286-579) PARI fehérjét. Ez nem tartalmazta a PARI UvrD-helikáz doménjét, de megtalálhatóak rajta a PIP (PCNA interakciós) és a SIM (SUMO interakciós) motívumok. A kísérlet során I-SceI endonukleáz segítségével kettősszálú törést hozunk létre a sejtek genomjában. Ha ennek javítása homológ rekombinációval történt a sejtekben, az iGPF-t használva templátként, a GFP génje helyreállt, és a sejtekben zöld fluoreszcenciát detektálhattunk áramlási citométer segítségével. Ebből következtettünk a homológ rekombináció mértékére a sejtpopulációban. Eredményeink alapján megállapítható, hogy amennyiben túltermeljük a teljes hosszúságú PARI fehérjét, a homológ rekombinációs események száma szignifikánsan lecsökken a sejtpopulációban. Meglepő módon a teljes hosszúságú és a deléciós PARI fehérje esetében is hasonló méretű csökkenést detektáltunk, ami arra enged következtetni, hogy a PARI UvrD-helikáz doménje nem szükséges a homológ rekombináció gátlásához. A továbbiakban ezt az N-terminális deléciós PARI fehérjét alkalmaztuk a kísérleteinkben. A minták feléből sejtlizátumot készítettünk, és western blot segítségével igazoltuk PARI fehérje túltermelését a kísérlet során (14. ábra).



14. ábra: A PARI fehérje gátolja a homológ rekombinációt *in vivo*

(A) A kísérlet során termelt fehérjék sematikus ábrázolása: Az egyik plazmid a teljes hosszúságú PARI fehérje túltermelését biztosította, a másik egy N-terminális deléciót (286-579) tartalmaz. Ez utóbbiból hiányzik a PARI helikáz doménje. A PCNA, illetve a SUMO fehérjék kötéséért felelős motívumokat kódoló régiók mindkét plazmidon megtalálhatóak. (B) DR-GFP riporterrendszer segítségével a homológ rekombinációs események mértékére következtethetünk a GFP + sejtek számából, teljes hosszúságú, illetve N-terminális deléciót tartalmazó PARI fehérje túltermelése esetén. Minden mérés esetében 20 000 sejtet mértünk áramlási citométer segítségével, 3 párhuzamos mintával. A grafikon három független kísérlet eredményét mutatja be. A hibasávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle *t* próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ (C) Western blottal, anti-Flag ellenanyaggal ellenőriztük, hogy a PARI fehérjét valóban túltermeltettük a sejtekben a kísérlet alatt. Belső kontrollként anti-PCNA-t alkalmaztunk az endogén PCNA kimutatására.

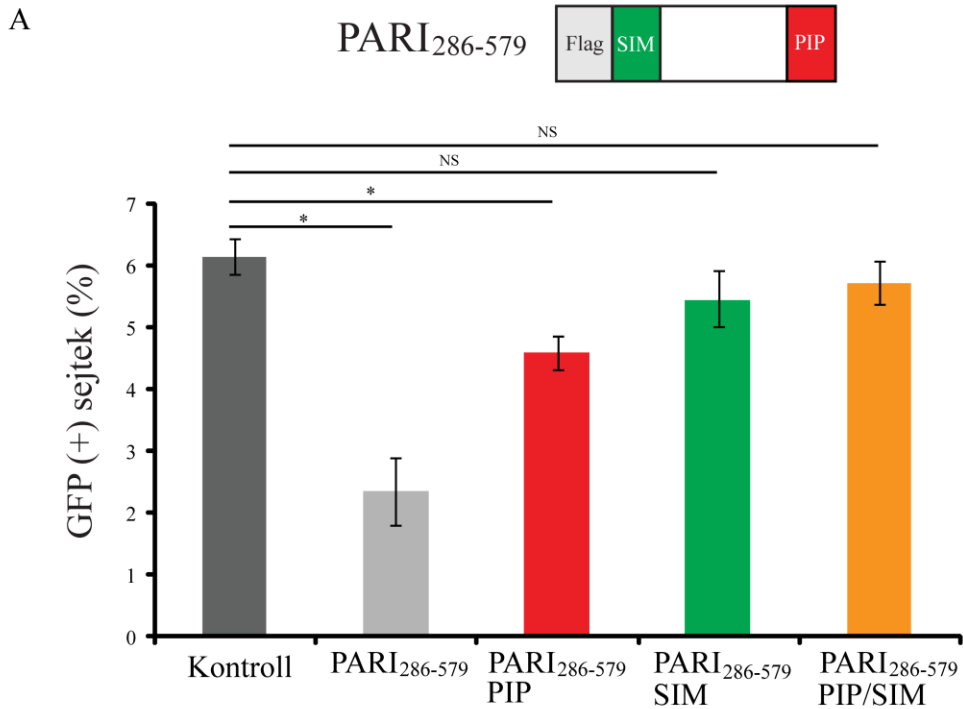
6.3. A PARI fehérje PIP és SIM motívumai fontos szerepet töltenek be a rekombinációs folyamatok szabályozásában

A PARI fehérje a SUMOilált PCNA-hez a PIP (PCNA-interakciós) és SIM (SUMO-interakciós) motívumain keresztül kötődik. Ezek a motívumok rendkívül konzerváltak a gerincesekben (15. ábra).

<u>SIM</u>		<u>PIP</u>	
Majority	<u>XL LVL LDEE</u>	Majority	<u>QX KL T QF F</u>
	355 363		570 577
<i>H. sapiens</i>	A L L V L L D E E	<i>H. sapiens</i>	Q A K L T Q F F
<i>M. musculus</i>	I L L V L L D E E	<i>M. musculus</i>	Q T K L T Q F F
<i>R. norvegicus</i>	I L L V L L D E E	<i>R. norvegicus</i>	Q T K L T R F F
<i>B. taurus</i>	A L L V L L D E E	<i>B. taurus</i>	Q T K L T Q F F
<i>G. gallus</i>	V L L V L L D E E	<i>G. gallus</i>	Q A K L T Q F F
<i>X. laevis</i>	T L L K L L D E E	<i>X. laevis</i>	Q A K L T S F F
<i>D. rerio</i>	V L M A L L D E E	<i>D. rerio</i>	Q G K L T G F F

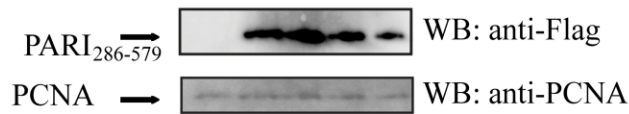
15. ábra: A PARI fehérje SIM és PIP motívumai konzerváltak gerincesekben⁷¹

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a PARI fehérje PIP, illetve SIM motívumai milyen szerepet töltenek be a homológ rekombináció szabályozásában. Ehhez egyes (PIP (576FF-AA) vagy SIM (356LLVL-PAAP)), illetve kettős (PIP/SIM (356LLVL-PAAP/576FF-AA)) pontmutáns fehérjék termelését biztosító plamidokat hoztunk létre. Ezeket alkalmaztuk a további kísérleteinkben. Elsőként azt vizsgáltuk meg a DR-GFP riporterrendszerben, hogy ezek expressziója hogyan hat a rekombinációra a sejtekben. Eredményeink alapján a vad típusú PARI fehérje, az előző fejezetben leírtakhoz hasonlóan, szignifikánsan csökkentette a rekombináció mértékét a sejtpopulációban. A PIP, SIM egyes, valamint a PIP/SIM kettős pontmutáns fehérjék túltermelése azonban kevésbé csökkentette a homológ rekombinációs események számát, mint a vad típusú PARI, ezért ezek a domének (ezáltal nagy valószínűséggel a PARI SUMOilált PCNA-vel való interakciója) jelentős szerepet tölthet be a rekombináció-függő folyamatok szabályozásában. A mutáns fehérjék túltermelését western blot segítségével ellenőriztük (16. ábra).



B

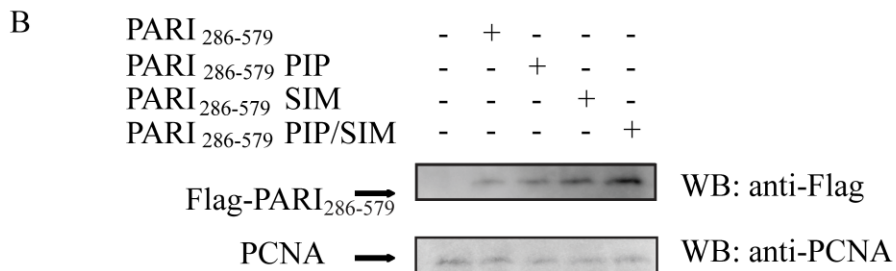
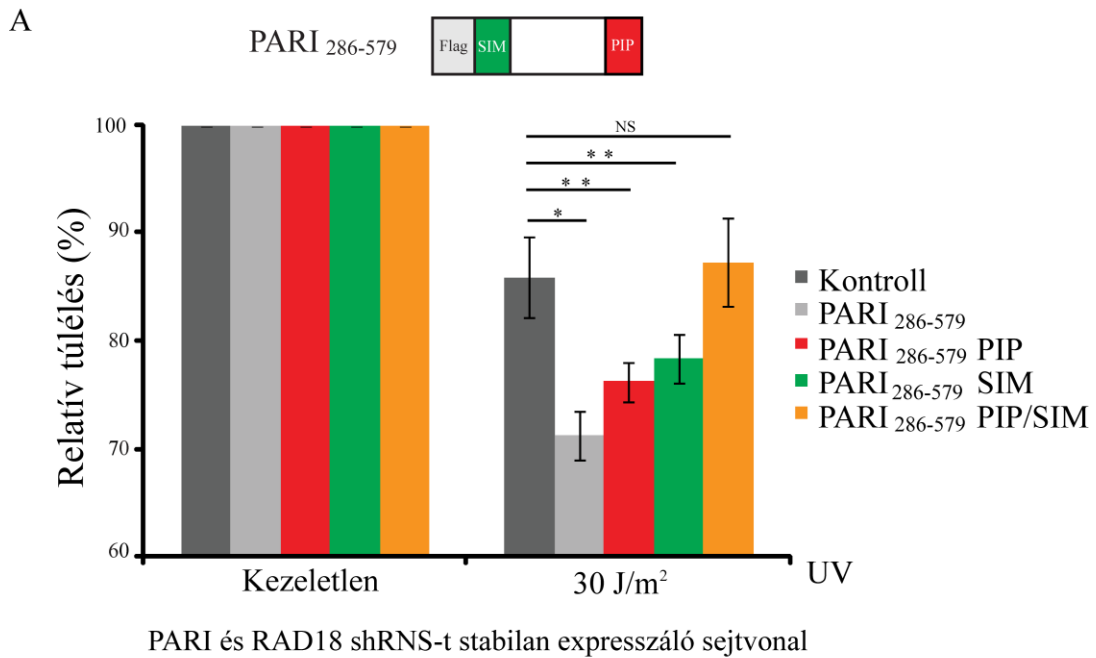
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉	-	+	-	-	-
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉ PIP	-	-	+	-	-
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉ SIM	-	-	-	+	-
Flag-PARI ₂₈₆₋₅₇₉ PIP/SIM	-	-	-	-	+



16. ábra: A PARI fehérje PIP és SIM doménjei fontos szerepet töltenek be a homológ rekombináció szabályozásában

(A) DR-GFP riporterrendszer segítségével a homológ rekombinációs események mértékére következtethetünk a GFP + sejtek számából vad típusú, illetve PIP, SIM és PIP/SIM pontmutáns fehérjék túltermelése esetén. Minden mérés esetében 20 000 sejtet mértünk áramlási citométer segítségével, 3 párhuzamos mintával. A grafikon három független kísérlet eredményét mutatja be. A hibásávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle t próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ (B) A fehérjék túltermelését western blottal, anti-Flag ellenanyaggal ellenőriztük. Belső kontrollként anti-PCNA ellenanyagot használtunk az endogén PCNA kimutatására.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a PARI PIP, SIM egyes és PIP/SIM kettős pontmutások hogyan befolyásolják a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységét. Ehhez PARI és RAD18 shRNS-eket stabilan expresszáló kettős csendesített sejt vonalakat alkalmaztunk. A túltermelt fehérjéket kódoló plazmidok shRNS rezisztens konstrukciók, ugyanis a termelt shRNS nem képes az mRNS-ükhöz hibidizálni, ezáltal nem valósulhat meg az RNS interferencia. A PARI-RAD18 kettős csendesített sejt vonalakban termeltettük túl a PARI PIP, SIM egyes és PIP/SIM kettős pontmutásokat, és megvizsgáltuk a sejtek túlélését UV-sugárzással szemben. Ehhez áramlási citométer alapú túlélési kísérleteket végeztünk, amely során a vizsgálni kívánt sejteket összekevertük egy GFP-t konstitutívan kifejező sejt vonallal. A GFP + és – sejtek arányából következtettünk a sejtek túlélésére. Eredményeink alapján az egyes pontmutások (PIP, SIM) csak mérsékelten csökkentették a RAD18-csendesített sejtek túlélését UV-sugárzás következtében, de a kettős mutás (PIP/SIM) esetében a kettős csendesítéshez viszonyítva nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, azaz gyakorlatilag a PARI-hiányához hasonló túlélést tapasztaltunk a sejtekben (17. ábra). A fehérjék expresszióját western blottal ellenőriztük.

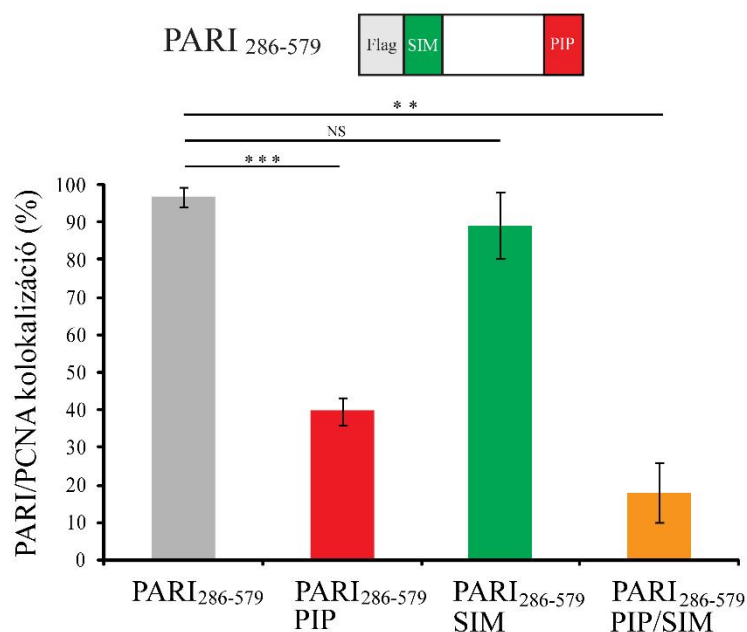
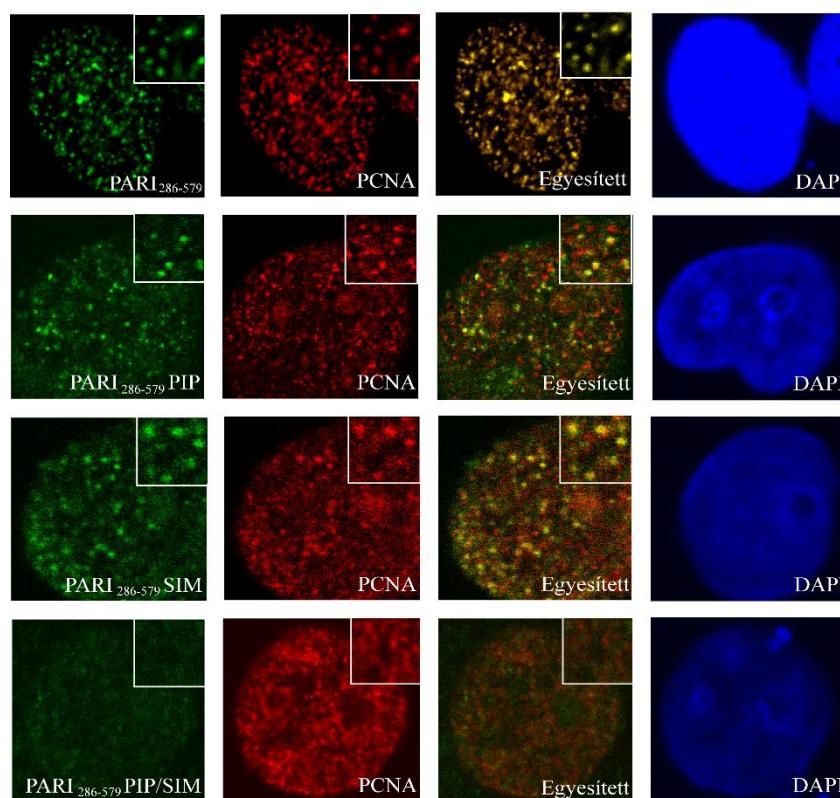


17. ábra: A PARI PIP és SIM doménjei fontosak a homológ rekombináció gátlásához

(A) Áramlási citométer alapú túlélési kísérlet segítségével vizsgáltuk meg hogy PIP, SIM és a PIP/SIM pontmutások hogyan befolyásolják a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységet. A mérési eredményeket minden minta esetében a saját kezeletlen kontrolljára normalizáltuk, így ábrázoltuk százalékosan a relatív túlélést. Minden mérés esetében 20 000 sejtet mértünk áramlási citométer segítségével, 3 párhuzamos mintával. A grafikon három független kísérlet eredményét mutatja be. A hibaszávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle t próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ (B) A fehérjék túltermelését western blot segítségével, anti-Flag ellenanyaggal ellenőriztük. Belső kontrollként anti-PCNA ellenanyaggal az endogén PCNA-t mutattuk ki.

6.4. A PARI fehérje lokalizációja főként a PIP doménjétől függ

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, pontosan milyen szerepet tölt be a PARI fehérje működésében a PIP és a SIM doménje, lokalizációs vizsgálatokat végeztünk. A vad típusú, az egyes (PIP és SIM), valamint kettős (PIP/SIM) mutánsokat anti-Flag, a PCNA-t mint a replikációs villa markerét, anti-PCNA antitesttel követtük. A fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagok segítségével, mikroszkóp segítségével vizsgálni tudtuk a célfehérjéinket, illetve azok lokalizációjának egymáshoz való viszonyát. Az ábrán a PARI fehérje zöld, a PCNA piros jelként látható. A sejtmagokat DAPI-val festettük, ezt kék szín jelöli. Ezekről konfokális mikroszkóp segítségével készítettünk képeket, melyeket ezt követően elemeztünk. Meghatároztuk, hogy a sejtek hány százalékában kolokalizál a PCNA és a PARI fehérje (azaz mutat átfedést a piros és a zöld fluoreszcencia). Ezt ábrázoltuk kvantitatív módon. Eredményeink alapján a vad típusú PARI fehérje fókuszokat formált, és közel teljes kolokalizációt mutatott a PCNA fehérjével. A PIP mutáns ugyan fókuszokat formált, de ezek, az esetek csaknem felében, nem estek egybe a PCNA-fókuszokkal. A SIM mutáns szintén fókuszt formált, és kolokalizációt mutatott a PCNA-vel. A kettős PIP/SIM mutáns elveszítette a fókuszformáló képességét, és értelemszerűen így nem is kolokalizált a PCNA fehérjével sem. Ebből levonhatjuk azt a konklúziót, hogy a PARI fehérjének mindkét doménjére szüksége van a megfelelő lokalizációhoz, azonban a PCNA-hez való lokalizációja főként a PIP doménjétől függ (18. ábra).

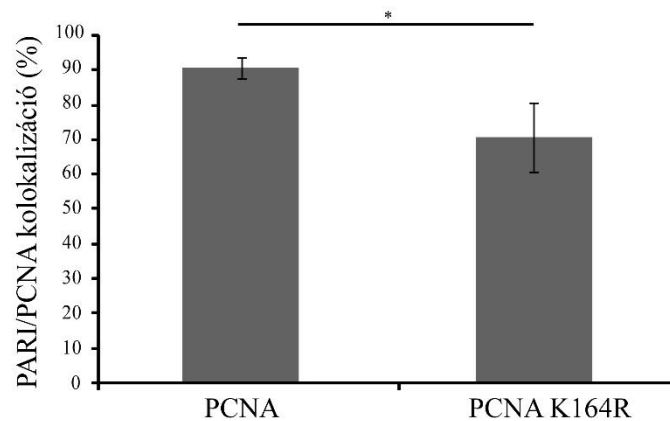
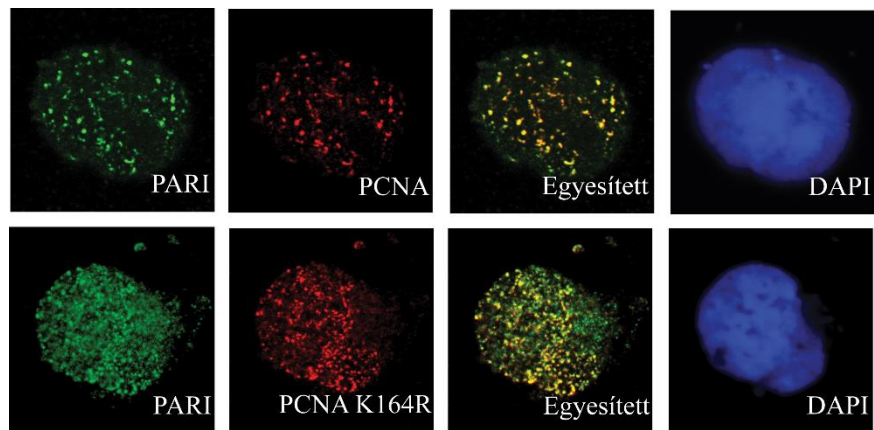


18. ábra: A PARI és PCNA fehérjék kolokalizációjának vizsgálata

A vad típusú és a PIP, SIM egyes pontmutáns fehérjék fókusz formáltak, a kettős PIP/SIM pontmutáns fókuszformáló képessége sérült. A vad típusú és SIM mutáns PARI fehérjék kolokalizálnak a PCNA-val, a PIP, illetve PIP/SIM kettős pontmutáns PCNA-val való kolokalizációja sérült. A kísérletek kvantitálásához 3 független kísérletben 50 sejtet használtunk fel mintánként. A grafikonon azt ábrázoltuk, hogy a sejtek hány százalékában estek egybe a PARI fókuszok a PCNA fókuszokkal. A hibasávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle t próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$

6.5. A PARI és a SUMOilálódni nem képes PCNA kolokalizációja sérül

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a PARI kötődik a SUMOilált PCNA-hez⁷¹, de ennek sejten belüli jelentőségéről még semmilyen információval nem rendelkezünk. A következő kísérletet azért terveztük, hogy megvizsgáljuk, hogy mi történik a PARI fehérje lokalizációjával a sejtekben, ha olyan PCNA van jelen, amely nem képes SUMOilálódni. Ehhez olyan PCNA expressziós vektort alkalmaztunk, amely a 164. lizinjén egy pontmutációt tartalmaz, így ez a PCNA mutáns nem képes SUMOilálódni. (Meg kell jegyeznünk itt, hogy ez a mutáns fehérje ubiquitilálódni sem tud.) Mivel a PCNA homotrimer gyűrűként van jelen a sejtekben, ezért shRNS-sel csendesítettük az endogén PCNA-t, hogy az lehetőleg ne befolyásolja a kísérlet eredményét heterotrimerek formálásával. Az átlatlunk expresszált PCNA shRNS rezisztens, azaz olyan pontmutációt tartalmazott, melynek köszönhetően az shRNS nem képes az mRNS-éhez hibridizálni, így az RNS interferencia nem valósulhatott meg. Emellett HA-PARI expresszióját biztosító plazmiddal is transzfektáltuk a sejteket. Ezt követően anti-HA, illetve anti-Flag immunfestést alkalmazva, fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagokkal, konfokális mikroszkóp segítségével detektálni tudtuk a fehérjék sejtmagon belüli lokalizációját. Az ábrán a zöld szín a PARI fehérjét jelöli, a piros a PCNA-t. A sejtmagot DAPI-val festettük, ezt kék szín jelöli. Az eredmény kvantitálását a grafikon mutatja be. Eredményeink alapján a PARI fehérje PCNA-vel való koloklizációja sérült, amennyiben SUMOilálódni nem képes PCNA volt jelen a sejtekben. Ebből arra következtethetünk, hogy a SUMOilált PCNA fontos szerepet tölt be a PARI fehérje lokalizációjának szabályozásában (19. ábra).

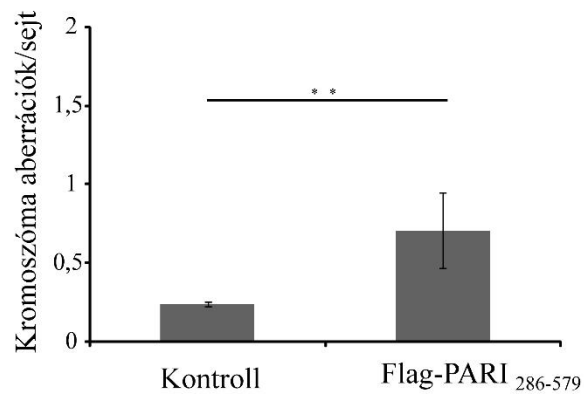
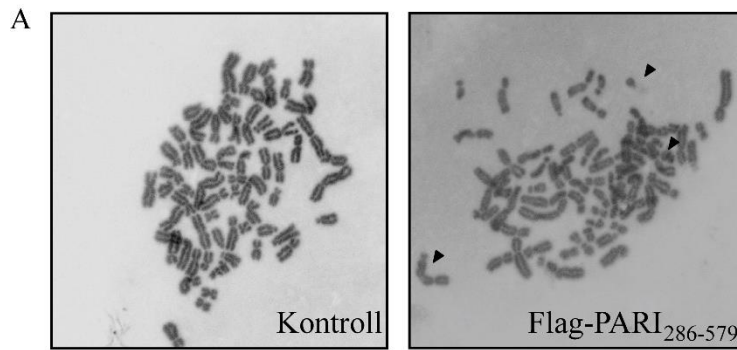


19. ábra: A PARI fehérje kolokalizációja sérül a SUMOírálni nem képes PCNA-vel

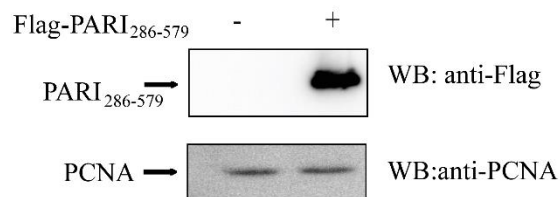
A PARI fehérje kolokalizációja sérül, ha SUMOírálni nem képes PCNA volt jelen a sejtekben. A kísérletek kvantitálásához 3 független kísérletben 50 sejtet használtunk fel mintánként. A grafikonon azt ábrázoltuk, hogy a sejtek hány százalékában esteke egybe a PARI fókuszok a PCNA fókuszokkal. A hibaszávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle t próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$

6.6. A PARI fehérje túltermelése genomi átrendeződésekhez vezethet

A sejtben zajló rekombinációs események egyensúlyát számos fehérje szabályozza. Alul- és túlműködése is súlyos következményekkel járhat: genomi instabilitáshoz vezethet. A homológ rekombinációs események gyakoriságának szabályozásán keresztül az általunk vizsgált PARI fehérje is jelentős szerepet tölt be a genom stabilitásának megőrzésében. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a PARI fehérje hiányában genomi instabilitás lép fel, hiszen a rekombináció gyakorisága megnövekszik a sejtekben⁷¹. Azt is kimutatták azonban, hogy egyes tumortípusokban túltermelődik a PARI fehérje^{74,75,79}. A következő kísérletben tehát azt vizsgáltuk meg, hogy mi történik a kromoszómák szintjén PARI túltermelődés esetén. Ehhez kromoszómaaberrációs vizsgálatot végeztünk olyan sejteken, amelyeket előzőleg transzfectáltunk Flag-PARI túltermelését biztosító plazmiddal. Ezt követően megállítottuk a sejteket M fázisban úgy, hogy demekolcint adtunk a tápoldathoz. Ezt követően preparáltuk a kromoszómákat, megfestettük Acridine Orange-al, és konfokális mikroszkóp segítségével fotókat készítettük. Ezek elemzésével készítettük el a kísérlet kvantitálását, melyet grafikonon ábrázoltunk. Eredményeink alapján a PARI fehérje túltermelése megnövekedett számú kromoszómatörésekhez és -füziókhoz vezetett. A PARI fehérje túltermelődését western blot-tal ellenőriztük (20. ábra).



B



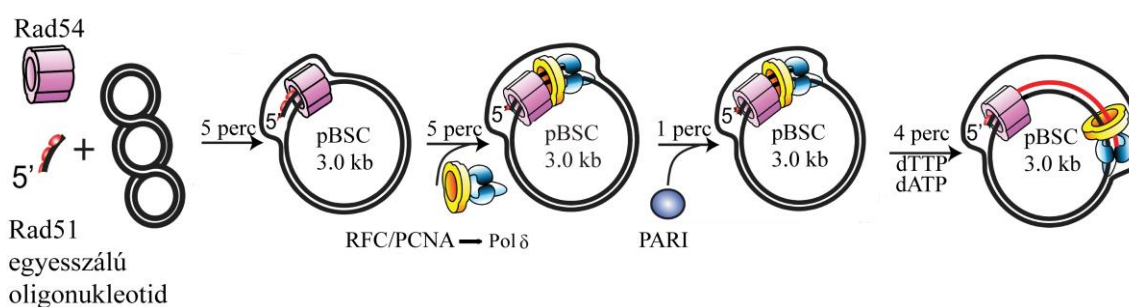
20. A PARI fehérje túlermelése genomikus instabilitást eredményez

(A) A PARI fehérje túlermelése következtében megnövekedett az aberráns (törött, fuzionált) kromoszómák száma a sejtekben. A grafikonon az ábrázoltuk, hogy egy sejten belül hány aberráns kromoszóma volt. A kísérletek kvantitálásához 3 független kísérletben 50 sejtet használtunk fel mintánként. A hibaszávok a standard deviációt jelölik, a szignifikancia tesztet Student-féle t próbával végeztük. A grafikonon található jelzések a következő módon kerültek elhelyezésre: NS: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ (B) A Flag-PARI fehérje túlermelődését western blot segítségével ellenőriztük anti-Flag ellenanyag segítségével. Belső kontrollként anti-PCNA ellenanyagot használtunk az endogén PCNA kimutatására.

A dolgozatom további részében biokémiai vizsgálatokat fogok bemutatni. Bár ezeket a kísérleteket nem én végeztem, szükségesnek érzem megemlíteni, hogy teljes képet kapjunk a PARI fehérje működési mechanizmusáról a homológ rekombináció gátlásában.

6.7. A PARI fehérje gátolja a D-hurok meghosszabbítását *in vitro*

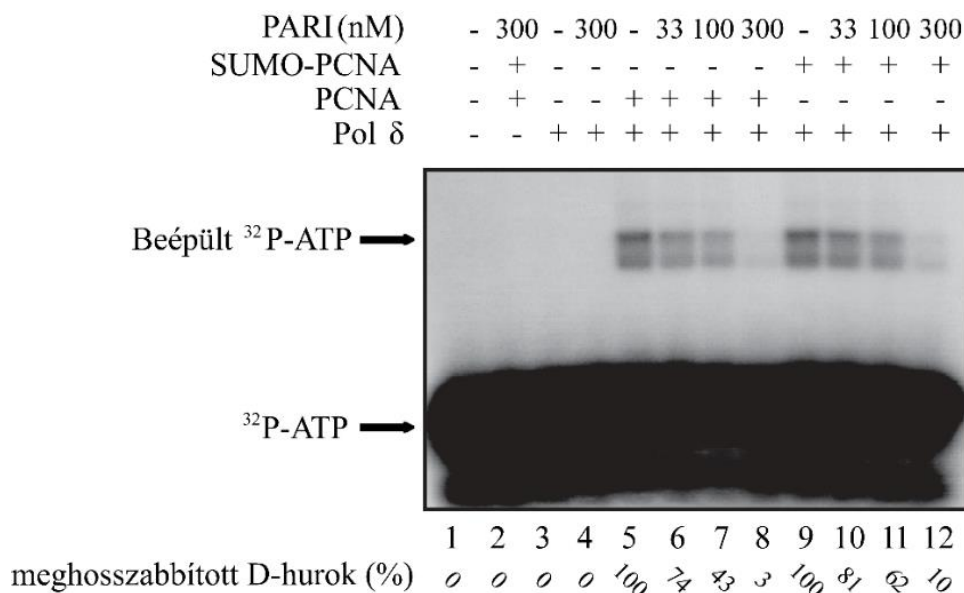
Munkánk során bebizonyítottuk, hogy a PARI fehérje fontos szerepet játszik a homológ rekombinációs események gyakoriságának szabályozásában. Azért, hogy megértsük a PARI fehérje szabályozó szerepének molekuláris mechanizmusát, egy D-hurok alapú modellrendszert alkalmaztunk, amely a következő módon működik: Egy 90 bp hosszúságú oligonukleotidot (D1) használunk, amelyhez első lépésben Rad51 fehérjét adunk. Ez a Rad54 fehérje segítségével képes megtalálni a D1 oligóval homológ régiót a pBluescriptSK (-) plazmidon. Ez a komplex katalizálja a száláthelyezést, így létrejön a D-hurok struktúra. Ezen a plazmid alapú D-hurok DNS szubsztráton szereljük össze a replikációs komplexet (RFC, PCNA és DNS polimeráz δ). Nukleotidok (dATP és dTTP) hiányában ekkor még nincs DNS szintézis. Ezen a ponton adjuk hozzá a PARI fehérjét, hogy képes legyen a replikációs komplexszel létrehozni a megfelelő interakciót. Ezután indítjuk el a DNS szintézist a hiányzó nukleotidok (dATP, dTTP) hozzáadásával. A DNS-szintézist kétféle módon is követhetjük. Az egyik a radioaktívan jelölt D1 oligonukleotid követése, a másik mód, hogy jelöletlen D1 oligonukleotidot alkalmazunk és a radioaktív nukleotidok (α - ^{32}P -dCTP) beépülését követjük (21. ábra)⁸⁰.



21. ábra: D-hurok alapú modellrendszer bemutatása

Az egyesszálú oligonukleotidhoz Rad51 fehérjék kapcsolódnak. A Rad54 segíti a „szálinváziót” a plazmidhoz. A RFC és a PCNA lehetővé teszi a polimeráz δ kapcsolódását. A reakció dTTP és dATP hozzáadásával indul el. Ha ezt megelőzően a célfehérjénket (PARI) hozzáadjuk a reakcióelegyhez, megvizsgálhatjuk annak hatását a D-hurok meghosszabbítására.

Elsőként azt vizsgáltuk meg a fent vázolt riporterrendszerben, hogy a teljes hosszúságú PARI fehérje hogyan befolyásolja a DNS szintézist a D-hurok szubsztráton, illetve hogyan hat a működésére a SUMOilált PCNA, hiszen egyrészt az élesztő Srs2 ezen funkciója SUMO-PCNA-függő, másrészt a sejtbiológiai vizsgálatok arra utaltak, hogy a PARI fehérje PIP és SIM motívumai jelentős szerepet töltenek be a fehérje működésében. Eredményeink alapján a teljes hosszúságú PARI erőteljesen gátolta a D-hurok meghosszabbítását. Srs2 esetében hasonló jelenséget tapasztalhatunk, azonban ez Srs2 esetében SUMO-PCNA függő. PARI estében azonban nem találtunk különbséget, ami arra utal, hogy *in vitro* elég lehet csak a PARI-PCNA interakció a D-hurok meghosszabbításának gátlásában (22. ábra).

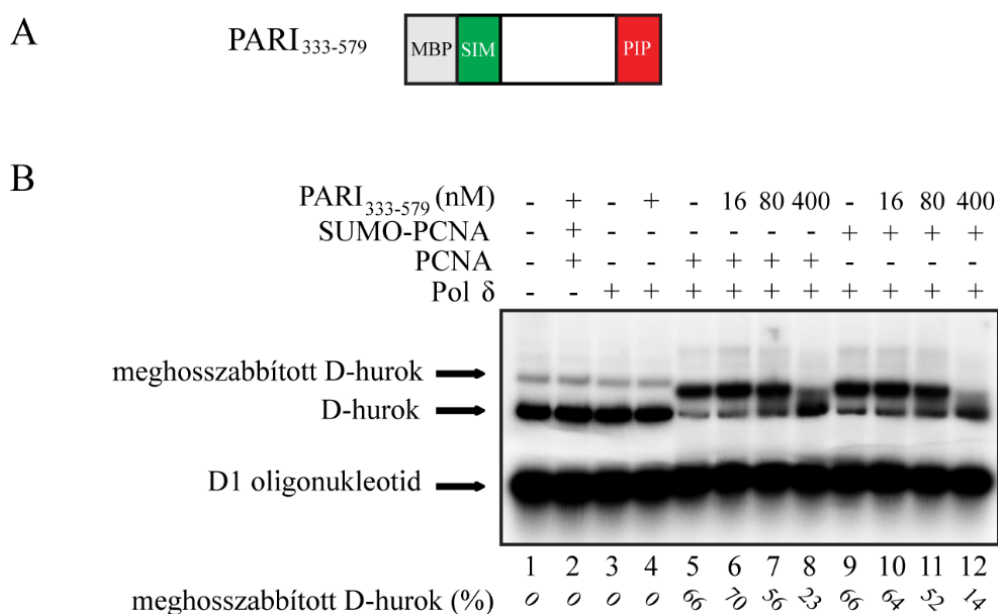


22. ábra: A teljes hosszúságú PARI fehérje gátolja a D-hurok meghosszabbítását

Az 6-8. mintában látható, hogy a PARI fehérje emelkedő koncentrációban egyre erőteljesebben gátolta a D-hurok meghosszabbítását PCNA jelenlétében. A 10-12. mintában a PARI fehérje növekvő koncentrációban egyre erőteljesebben gátolta a D-hurok meghosszabbítását SUMOilált PCNA jelenlétében. Ezt a beépült ³²P-ATP jelből következtethetjük. A gátlás mértékének számszerűsítését (meghosszabbított D-hurok (%)) Image J szoftver segítségével végeztük.

6.8. A PARI fehérje helikáz doménje nem szükséges a D-hurok meghosszabbításának gátlásában

A sejtbiológiai kísérletekhez hasonlóan biokémiai módszerekkel is szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a PARI fehérje helikáz doménje szükséges-e a fehérje működéséhez a rekombináció-függő folyamatokban. Ehhez ismételtelen egy N-terminális deléciót tartalmazó fehérje (333-579) expresszióját biztosító plazmidot alkalmaztunk. A következő lépésben tehát ennek a PARI fragmentnek a szerepét vizsgáltuk meg a D-hurok-alapú modellrendszerben. Eredményeink alapján azt tapasztaltuk, hogy ez a fehérje is - a teljes hosszúságú fehérjéhez hasonlóan - gátolta a D-hurok meghosszabbítását *in vitro*, azaz a PARI helikáz aktivitásának - az élesztő Srs2-höz hasonlóan - nincs szerepe e fehérjének ezen funkciójában (23. ábra).

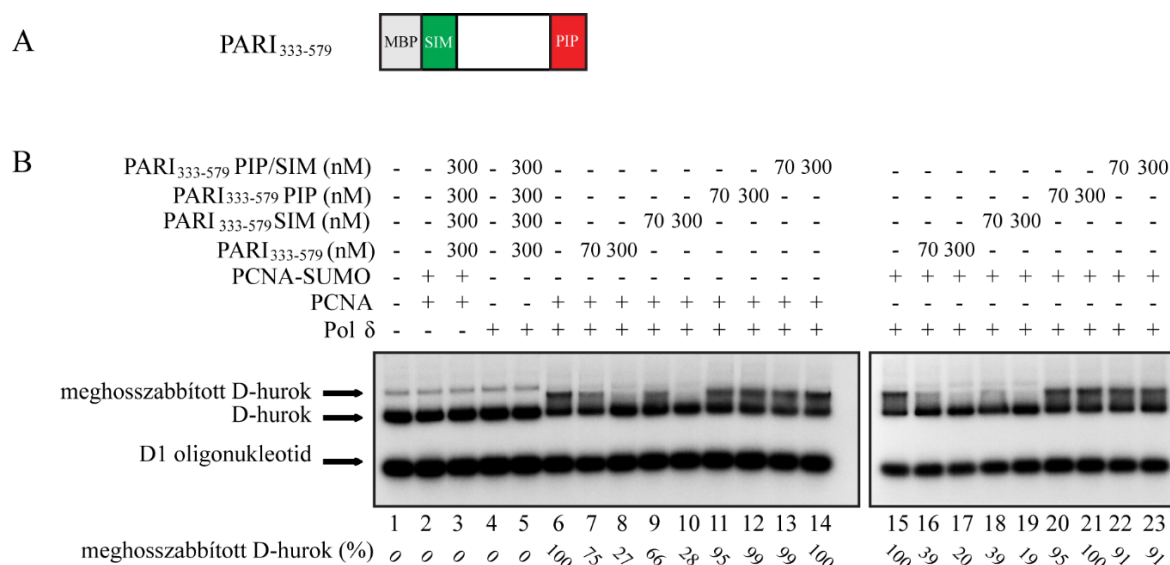


23. ábra: A PARI fehérje C terminális fragmentje gátolja a D-hurok meghosszabbítását

(A) A kísérlet során alkalmazott fehérje sematikus ábrázolása. Ez a fehérje egy N-terminális deléciót tartalmaz, melyből hiányzik a PARI helikáz doménje, A PCNA, illetve a SUMO fehérjék kötéséért felelős motívumok viszont megtalálhatóak. (B) Az 6-8., illetve 10-12. mintában látható, hogy a PARI fehérje emelkedő koncentrációban egyre erőteljesebben gátolta a D-hurok meghosszabbítását PCNA, illetve SUMO-PCNA jelenlétében. Ebben az esetben a D1 oligonukleotid jelölt radioaktívan. DNS szintézis esetén a meghosszabbított D-hurok kisebb mobilitást mutat a gélen, mint amikor nem történik DNS-szintézis. A gátlás mértékének számszerűsítését (meghosszabbított D-hurok (%)) Image J szoftver segítségével végeztük.

6.9. A PARI fehérje PIP doménje nélkülözhetetlen a D-hurok meghosszabbításának gátlásában

A sejtbioológiai kísérleteink arra utalnak, hogy a PARI PIP és SIM doménjei jelentős szerepet töltenek be a fehérje lokalizációjának szabályozásában, és a rekombináció gátlásában elakadt replikációs villa esetén. A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a PIP, SIM egyes és PIP/SIM kettős pontmutánsok hogyan befolyásolják a fehérje működését a D-hurok meghosszabbításának gátlásában. Ehhez PIP, SIM egyes és kettős pontmutánsokat hoztunk létre, és ezeket vizsgáltuk meg az *in vitro* modellrendszerünkben. Eredményeink alapján a PIP, illetve a PIP/SIM kettős pontmutáns aktivitása sérül D-hurok meghosszabbításának gátlása esetén, ami arra utal, hogy a PARI fehérje PIP doménje, azaz a PCNA-vel való interakciója nélkülözhetetlen ahhoz, hogy gátolni tudja a D-hurok meghosszabbítását *in vitro* (24. ábra).



24. ábra: A PARI PIP, SIM egyes és kettős pontmutánsok szerepe a D-hurok meghosszabbításának gátlásában

A vad típusú (7-8., 16-17. minta) illetve a SIM mutáns (9-10., 18-19. minta) PARI fehérjék koncentráció függő módon gátolják a D-hurok meghosszabbítását. A PIP (11-12., 20-21. minta) és a PIP/SIM (13-14., 22-23. minta) fehérjék nem gátolják a D-hurok meghosszabbítását. Ebben az esetben a D1 oligonukleotid jelölt radioaktívan. DNS szintézis esetén a meghosszabbított D-hurok kisebb mobilitást mutat gélen, mint amikor nem történik DNS-szintézis. A gátlás mértékének számszerűsítését (meghosszabbított D-hurok (%)) Image J szoftver segítségével végeztük.

7. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az örökítőanyag megkettőződése a legfontosabb feladat minden sejt számára. Ekkor adódik át ugyanis a sejt életéhez és működéséhez szükséges összes információ az utódsejtekbe. A replikáció során keletkező hibák súlyos következményekkel járhatnak mind testi-, mind ivarsejtekben. A testi sejtek osztódása során keletkező hibák rákos elváltozáshoz, a már tumoros sejt esetében gyógyszerrezisztenciához, áttétképződéshez, ivarsejtekben pedig genetikai betegségek kialakulásához vezethetnek, ugyanakkor az itt keletkező mutációk az evolúció motorjai is. Mivel a replikáció hibáinak ilyen komoly és szerteágazó következményei vannak, a folyamat megfelelő működése, minőség-ellenőrzése létfontosságú. A replikáció pontosságát számos tényező befolyásolja: a replikatív DNS polimerázok hűsége, az itt keletkező hibás beépülések javításának (mismatch repair) határfoka, valamint a templát DNS-szálon található hibák áthidalásának pontossága.

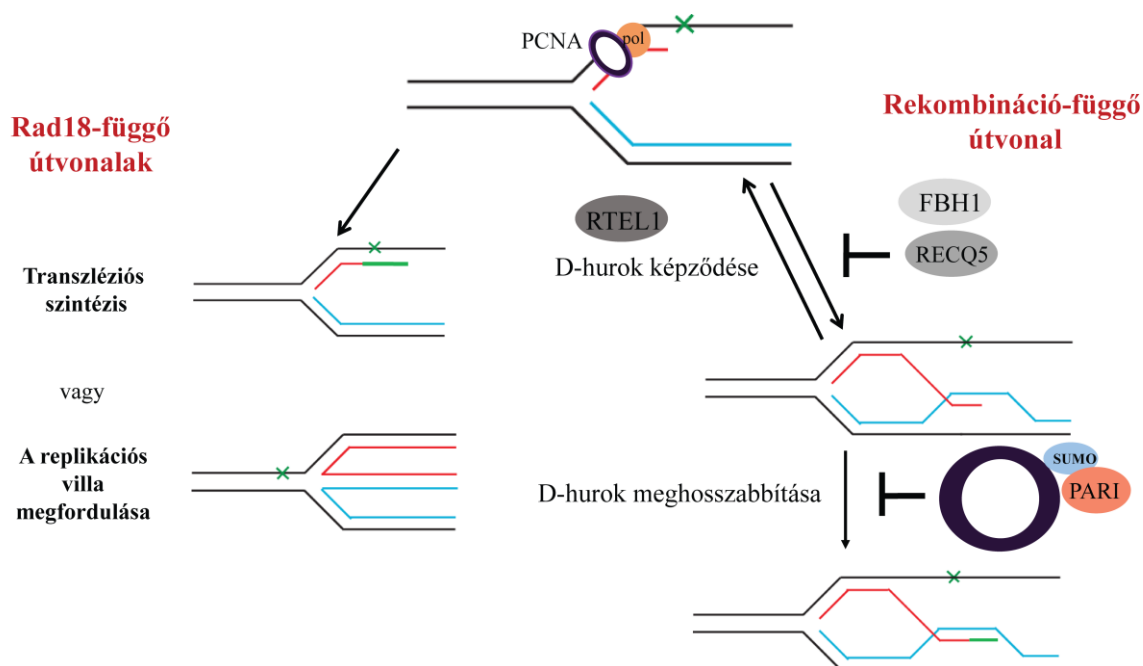
A sejteket folyamatosan érik külső és belső hatások, amelyek károsítják a DNS-t. Ezek egy része – a számos DNS-hibajavító útvonal működése ellenére is - fennmarad a sejtciklus S-fázisáig. Mivel a replikatív DNS polimerázok elsődleges funkciója az ép DNS szál nagy sebességű és rendkívül pontos másolása, így erre specializálódott, szűk aktív centrummal rendelkeznek. Ennek egyenes következménye, hogy amennyiben a templát DNS-szál sérül, ezek a polimerázok nem képesek áthidalni a hibás szakaszt, és megállnak. Az elakadt replikációs villák rendkívül veszélyesek a sejtek számára, mert egyrészt az időben be nem fejezett replikáció sejthalált indukál, másrészt az elakadt replikációs villák csupasz egyszálú DNS régiói könnyen törnek és az így formálódó kettősszálú lánctörések erősen toxikusak a sejt számára. Éppen ezért az elakadt replikációs villa menekítésére - amin a replikációs komplex hibás templát DNS szakaszon való átsegítését értjük - számos útvonal alakult ki. A DNS hibatolerancia útvonalak (TLS polimerázok és villavisszafordítás), a homológ rekombináción alapuló hibajavítás és a Fanconi anémia útvonal. Ezek hibamentes vagy hibás átírást tesznek lehetővé a sérült templát DNS-szállal szemben. A villa menekítésének módja tehát meghatározhatja az adott sejt további sorsát, hiszen egészen más következményei lehetnek egy egyszerű hibamentes átírásnak (pl. egy TLS polimeráz által végzett hibaátírás), mint egy bonyolult, veszélyes köztes termékeken keresztül megvalósuló villamenekítési mechanizmusnak (homológ rekombinációs hibajavítás). Éppen ezért könnyen belátható, hogy annak szabályozása, hogy melyik villamenekítő útvonal mikor és hol aktív, alapvető fontosságú.

Az elakadt replikációs villák menekítésében résztvevő útvonalválasztás szabályozását elsősorban *Saccharomyces cerevisiae*-ben végzett vizsgálatokkal írták le. Az UV-sugárzás következtében keletkezett DNS-hibáknál elakadt replikációs villa menekítése elsősorban DNS-hibatolerancia útvonalakkal történik, melyek működésének egyik meghatározó tagja a Rad18 fehérje. Ez az útvonal segíti át a replikációs komplexet a sérült templát DNS-szálon. Amennyiben a Rad18 fehérje hiányzik, ez az útvonal inaktív, a replikációs villát más módon kell menekíteni. Ekkor, a homológ rekombináció veszi át ezt a szerepet. Ha az Srs2 jelen van a sejtekben, gátolja a rekombinációt így a villa menekítése lassan vagy sehogyan sem történik meg, ami sejthalálhoz vezet. Az Srs2 hiánya azonban utat enged a rekombinációs eseményeknek, azaz az elakadt replikációs villa menekítése megtörténhet rekombináció-függő módon, ami bár veszélyes a sejt számára, de a replikáció időben befejeződhet, így a sejtek nagyobb arányban élnek túl az UV-sugárzást. Éppen ezért az élesztő Srs2 fehérje és interakciós partnere, a SUMO-PCNA fehérjék, kulcsfontosságúak az elakadt replikációs villák menekítésének a szabályozásában. Továbbá, az élesztő Srs2 fehérje szabályozó funkciójának többféle molekuláris mechanizmusa is ismert. Egyrészt interakcióba lép a Rad51-el és az Srs2 saját helikáz aktivitása révén eltávolítja a Rad51 fehérje által formált preszinaptikus filamentumokat, valamint feloldja a D-hurok struktúrát. Másrészt a helikáz aktivitásától függetlenül a PCNA-SUMO-val együttműködve képes gátolni a D-hurok meghosszabbítását, ezáltal megakasztja a rekombinációs hibajavítást, lehetőséget adva más hibajavító útvonalak aktiválódására.

Azt, hogy az emberi sejtekben ezek a szabályozó mechanizmusok hogyan mennek végbe, még nem ismerjük olyan részletességgel, mint élesztő esetében. Általánosságban igaz az, hogy a fő szabályozó mechanizmusok konzerváltak, de magasabb rendű eukariótákban megjelenik egy nagyfokú redundancia. Jó példa erre a TLS polimerázok számának növekedése. Illetve az Srs2 fehérjének is több humán funkcionális homológja ismert, mint a PARI, az RTEL1, FBH1 vagy a RECQ5. Az FBH1 és RECQ5 fehérjék helikáz aktivitásuk révén a Rad51 által alkotott preszinaptikus filamentumokat szedik szét. Az RTEL1 fehérjéről kimutatták, hogy a helikáz aktivitása révén a D-hurok feloldásában játszik szerepet. A PARI fehérje (PCNA-Associated Recombination Inhibitor) anti-rekombináz hatását, valamint SUMOilált-PCNA-val való interakcióját ugyan leírták már kutatásaink megkezdése előtt is, de annak molekuláris mechanizmusa még nem volt tisztázott.

Munkánk során sejtbiológiai és biokémiai módszerekkel megvizsgáltuk, hogy hogyan fejti ki anti-rekombináz hatását a PARI fehérje, és ez hogyan függ a SUMOilált PCNA-vel való interakciójától. Olyan túlélési vizsgálatokat végeztünk emberi sejtkultúrákon, amelyek segítségével kimutattuk, hogy a PARI csendesítése menekítette a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységét, hasonlóan az Srs2 esetén élesztőben. Ezzel kimutattuk, hogy a PARI anti-rekombináz funkciója az Srs2-höz hasonlóan a rekombinációs folyamatok gátlásán keresztül valósulhat meg. A PARI fehérje túltermeltetése pedig éppen az ellenkező hatást váltotta ki: A RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenysége nőtt, hiszen a DNS-hiba ebben az esetben sem rekombináció-, sem Rad18-függő módon nem menekíthető. A PARI szabályozó funkciójának fontosságát kromoszómaaberrációs vizsgálatokkal is kimutattuk, mivel a PARI fehérje túltermeltetése a sejtekben megnöveli a kromoszómatörések és -fúziók számát. Azaz a PARI szabályozó funkciójának hibája nagyon súlyos következményekkel járhat a sejt életében, genomikus instabilitáshoz, és -átrendeződésekhez vezethet. Egy GFP-alapú riporterrendszer segítségével, direkt vizsgálatokkal is bebizonyítottuk, hogy a PARI fehérje gátolja a homológ rekombinációs eseményeket a sejtben. Azt is meghatároztuk, hogy a HR gátláshoz a PARI fehérjének nincs szüksége a helikáz doménjére, ugyanakkor a PIP (PCNA interakciós peptid) és SIM (SUMO interakciós motívum) motívumai jelentős szerepet töltenek be ezen funkciójában. Ezt az eredményt újabb túlélési vizsgálatokkal is megerősítettük. Ezekben a kísérletekben a kettős mutáns PARI fehérje (PIP/SIM) menekítette a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységét, ami azt jelenti, hogy a homológ rekombinációt nem gátolta ez a PARI mutáns fehérje *in vivo*. A továbbiakban mikroszkópos analízis segítségével kimutattuk, hogy a fehérje megfelelő intracelluláris lokalizációjához is szükségesek a PIP és a SIM domének jelenléte, valamint a SUMOilált PCNA is. Ebből arra következtettünk, hogy valószínűleg a SUMO-PCNA targetálja a PARI fehérjét az elakadt replikációs villához. PARI fehérje rekombináció gátlásában betöltött szerepének molekuláris mechanizmusának felderítéséhez egy biokémiai modellrendszert használtunk. Ennek segítségével bebizonyítottuk, hogy a PARI fehérje gátolja a D-hurok meghosszabbítását. Ehhez elengedhetetlen a PCNA fehérjével való kölcsönhatása, ugyanakkor a PCNA SUMOilációja itt nem volt meghatározó, ellentétben az élesztő szabályozási rendszerrel, Srs2 esetén. Így a jelenlegi elképzelésünk szerint, mivel *in vivo* a PARI SUMO és PCNA kötő doménje is létfontosságú volt a szabályozó funkciójának ellátásában, ezért valószínűsíthető, hogy a PCNA SUMOilációja a PARI targetálásában, a PCNA kötése pedig a D-hurokban történő DNS szintézis gátlásában játszik szerepet.

Amíg élesztőben tehát a rekombináció gátlását az Srs2 több szinten végzi el, addig ez a „feladat” humán sejtekben több fehérje között oszlik el. Az FBH1 vagy a RECQ5 fehérjék aktív helikáz doménnel rendelkeznek, így feltehetően a D-hurok képződését gátolják meg. Az RTEL1 a D-hurok struktúrák szétszerelésében játszik szerepet. A PARI fehérje pedig azáltal, hogy a D-hurok meghosszabbítását gátolja, lecsökkenti annak esélyét, hogy átkereszteződések történjenek, megakadályozva ezzel az esetleges genomi átrendeződéseket (25. ábra).



25. ábra: A rekombináció-függő folyamatok gátlásának modellje

Az elakadt replikációs villát a Rad18-függő mechanizmusok és a rekombináció-függő útvonal menekítheti. Ez utóbbit humán sejtekben több fehérje gátolhatja. Pl. Az FBH1 és a RECQ5 fehérjék a D-hurok képződését gátolják meg, az RTEL1 a D-hurok szétszerelését teszi lehetővé. Kísérleteink alapján a PARI fehérje a SUMO-izált PCNA-vel együttműködve gátolja a D-hurok meghosszabbítását, így megakadályozza a nemkívánt rekombinációs eseményeket, illetve annak káros következményeit, az átkereszteződéseket és a genomi instabilitást.

8. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

Örökítőanyagunk tartalmazza az összes információt, ami a sejtek működéséhez és felépítéséhez szükséges, emiatt pontos másolása, és szerkezetének megőrzése létfontosságú. A DNS azonban számos belső és környezeti hatásnak kitett, melyek megváltoztathatják a szerkezetét. Ez azonban súlyos következményekkel járhat. A hibás DNS mutációk kialakulásához vezethet, azok pedig megváltoztathatják az információtartalmát. Bár ez az evolúció mozgatórugója, a felhalmozódott mutációk a sejtek halálát vagy rákos elváltozását is okozhatják.

A különböző hibák eltávolítására számos DNS-hibajavító útvonal alakult ki. Ezek specifikusan felismerik a változásokat, és igyekeznek a lehető leggyorsabban és leghatékonyabban eltávolítani azokat. Ennek ellenére mégis előfordul, hogy egy hiba fennmarad a sejtciklus S fázisáig. Ekkor történik meg a DNS megkettőződése, a replikáció. A másolást végző replikatív polimerázok a DNS pontos és gyors másolására alakultak ki, a hibás régió azonban nem képesek áthaladni szűk aktív centrumuk miatt. Így, ha hibás szakaszhoz érnek, a replikáció megáll. Ha ez elhúzódik, a replikációs villa eltörhet, ami genomi átrendeződésekhez és sejtihalálhoz vezethet. Egyértelmű tehát, hogy a sejt számára esszenciális, hogy a replikáció folytatódjon. Erre több megoldás létezik, melyet főként *Saccharomyces cerevisiae*-ben végzett kísérletekkel jártak körbe. A DNS-hibatolerancia útvonalak meghatározó fehérjéje a Rad18. Ennek két lehetséges mechanizmusa ismert. Az egyik az úgynevezett *transzléziós szintézis* (TLS), amely során a replikatív polimeráz helyét egy alternatív polimeráz veszi át, ami tágabb aktív centrummal rendelkezik, és képes nukleotidot beépíteni a hibával szemben. Ezek az enzimek azonban gyakran vétének hibát, azaz sokszor nem a megfelelő nukleotidot építik be a károsodott DNS-sel szemben. Ez tehát pontmutációk kialakulásához vezethet. A polimeráz η azonban kivételt képez, ugyanis hibamentes átírást tesz lehetővé, mert az UV-sugárzás által okozott T-T dimerekkel szemben képes A-A-t beépíteni, így nem alakul ki pontmutáció. A másik lehetséges mechanizmus a *replikációs villa visszafordulása*. Ebben az esetben az újonnan szintetizálódott hibamentes szál szolgál templátként a DNS megkettőződéséhez. Ez sem jár pontmutációk kialakulásával. Az elakadt replikációs villa menekítése azonban megtörténhet *rekombináció-függő módon* is, amely során a másolás egy homológ régióról történik a Rad51 fehérje által szabályozott módon.

Az, hogy adott esetben melyik útvonal aktív, szigorú szabályozás alatt áll, hiszen nem mindegy a sejt számára, hogy egy gyors, bár sok esetben pontmutációval járó transzlációs szintézis zajlik épp, vagy egy bonyolult, instabil, sérülékeny struktúrákon keresztül végbemenő, ám de pontos rekombinációs útvonal. Amíg élesztőben ez nagyon alaposan vizsgált, jól jellemzett rendszer, humán sejtekben nagyon keveset tudunk arról, hogyan is történik az útvonalválasztás. Ebben jelentős szerepe van a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) fehérjének, illetve a poszttranszlációs módosításainak. A PCNA-nek több poszttranszlációs módosítása is ismert, azonban az ubiquitilációja és a SUMOilációja a leginkább jellemzett folyamatok. A fehérje ubiquitilációja a Rad18-fehérjétől függ. Monoubiquitilációja iniciálja a polimerzaváltást, poliubiquitilációja pedig a replikációs villa visszafordulását. A PCNA fehérje SUMOilációja a rekombináció-függő folyamatok gátlásában játszik szerepet. Élesztőben a rekombináció gátlását az Srs2 fehérje is szabályozza, méghozzá több módon. Egyrészt ATP-függő helikáz aktivitása révén képes feloldani a Rad51 által alkotott preszinaptikus filamentumot és a kialakult D-hurkot, másrészt interakcióba lép a SUMOilált PCNA-vel, és meggátolja a D-hurok meghosszabbítását. Ezáltal megállítja a rekombinációs hibajavítást, és utat enged a Rad18-függő útvonalaknak. A sejtekben ugyanis az UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa menekítését a Rad18-függő útvonalak végzik. Ha a sejtekben nincs jelen a Rad18 fehérje, a szerepét a rekombináció-függő útvonal veszi át. Srs2 jelenlétében azonban ez gátolt, így a sejtek megnövekedett érzékenységet mutatnak UV-sugárzással szemben. Ha az Srs2 hiányzik, a rekombináció-függő útvonal felszabadul a gátlás alól, így az elvégezheti az UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa menekítését a Rad18-függő útvonalak hiányában is, ezért a sejtek nagyobb túlélést mutatnak UV-sugárzással szemben. Humán sejtekben azonban ez nem ennyire egyértelmű. Az Srs2 fehérjének több funkcionális homológja ismert. Az FBH1 és RECQ5 fehérjék helikáz aktivitásuk révén a Rad51 által alkotott preszinaptikus filamentumok szétszerelésében játszanak szerepet. Az RTEL1 szintén helikáz aktivitása révén a D-hurok feloldását teszi lehetővé. A PARI (PCNA-Associated Recombination Inhibitor) fehérje rekombinációt gátló hatása, és SUMO-PCNA-vel való interakciója ismert volt korábban, de ezek szerepét, illetve rekombinációban betöltött pontos mechanizmusát még nem vizsgálták.

Kutatásunk fő célja volt, hogy megvizsgáljuk a PARI és a SUMOilált PCNA interakciójának szerepét a rekombinációs események szabályozásában, elakadt replikációs villa esetén.

Munkánk során sejtbioológiai és biokémiai módszerekkel megvizsgáltuk, hogyan szabályozza a PARI fehérje a homológ rekombinációt elakadt replikációs villa esetén és ez hogyan függ a SUMOilált PCNA-tól. Az élesztő Srs2-kísérletekhez hasonlóan kimutattuk, hogy a PARI-hiánya hogyan befolyásolja a sejtek túlélését RAD18-hiányos sejtekben. Ehhez shRNS alapú csendesített sejt vonalakat használtunk. Eredményeink alapján a PARI-hiánya menekítette a RAD18-csendesített sejtek UV-érzékenységét. Ennek magyarázata az élesztőben tapasztaltakhoz nagyon hasonló: Az UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa menekítését vad típusú sejtekben, ez esetben is a Rad18-függő útvonalak végzik. Rad18 hiányában a rekombinációs mechanizmus veszi át a szerepét. Ha a PARI jelen van a sejtekben, a rekombináció gátolt, csendesítése esetén azonban felszabadul a gátlás alól, és lehetővé teszi a replikációs villa menekítését Rad18 hiányában is. Így a kettős csendesített sejtek kevésbé lesznek érzékenyek UV-sugárzásra, mint a RAD18-csendesített sejtek önmagukban. A PARI túltermeltetése éppen az ellenkező hatást váltotta ki RAD18-csendesített sejtekben, a sejtek UV-érzékenysége nőtt, hiszen a replikáció sem RAD18-, sem rekombináció-függő módon nem valósulhatott meg. Egy GFP-alapú, homológ rekombinációt mérő riporterrendszerrel kimutattuk, hogy a PARI fehérje gátolja a homológ rekombinációs eseményeket, és ez nem függ a helikáz aktivitásától, a PIP (PCNA interakciós peptid), és SIM (SUMO interakciós motívum) doménjei azonban jelentős szerepet játszanak benne. Ezt igazolták további túlélési vizsgálatok is. A kettős pontmutáns (PIP/SIM) PARI fehérje ugyanis menekítette a RAD18-sejtek UV-érzékenységét, azaz nem gátolta a homológ rekombinációt a sejtekben. Mikroszkópos vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a PARI fehérje megfelelő lokalizációjához szükséges mind a PIP, mind a SIM doménje, és a SUMOilált PCNA-vel való interakciója is. Kromoszómaaberrációs vizsgálatokkal rávilágítottunk arra, hogy a PARI fehérje túltermelése (korábban publikált eredmények alapján a hiánya is) megnöveli az aberráns kromoszómák számát a sejtekben. A fehérjének tehát nagyon fontos szerepe van a genom egyensúlyának, stabilitásának fenntartásában. A fehérje pontos biokémiai működésének jellemzéséhez egy D-hurok alapú modellrendszer alkalmaztunk. Ennek segítségével mutattuk ki, hogy a PARI fehérje gátolja a D-hurok meghosszabbítását, azonban ebben a modellrendszerben ez PCNA-függő volt, a SUMO-ilált PCNA-nek nem volt meghatározó szerepe, az élesztő Srs2-vel ellentétben, ahol ez az aktivitás a biokémiai modellrendszerben is SUMO-PCNA-függő volt. A sejtbioológiai kísérletek alapján azonban a SUMO-PCNA igen fontos szerepet tölt be a fehérje lokalizációjában, így az a hipotézisünk, hogy a PCNA SUMOilációja a PARI targetálásában játszik szerepet, míg a PCNA-vel való interakciója a D-hurok meghosszabbításának gátlásában nélkülözhetetlen.

Amíg élesztőben tehát a rekombináció gátlását az Srs2 „egymaga” végzi, humán sejtekben ez egy összetettebb folyamat, több fehérje összehangolt működése szabályozza. A PARI fehérje szerepe ebben az, hogy a SUMO-PCNA-vel együttműködve gátolja a D-hurok meghosszabbítását, megakasztva ezzel a rekombinációt. Így teszi lehetővé, hogy az UV-sugárzás következtében elakadt replikációs villa menekítése, Rad18-függő útvonalak révén valósuljon meg. A PARI fehérje tehát egyensúlyt tart fenn az alternatív útvonalak között, elakadt replikációs villa menekítésekor.

9. SUMMARY OF THE THESIS

Our DNA encodes all the information required for the function and structure of cells, thus, its correct duplication and preservation of its structure is essential. The genome is exposed to several internal and external factors that can generate changes in it, leading to serious consequences: the damaged DNA can form mutations, which can change the encoded information. Though it is the driving motor of evolution, the accumulation of the mutations can lead to cancer predisposition or cell death.

Several DNA repair pathways have evolved for the removal of different types of damage. They can recognise the specific changes and remove them in a fast and most efficient way. However, damaged sites may remain without being removed until the S phase of the cells, where the duplication of the DNA, replication, takes place. The replicative polymerases evolved to perform precise and quick copying from the template DNA, but they cannot pass the damaged site because of their small active centre. When they reach the damage, replication stops. Long stalling of the replication can cause replication fork break, leading to genomic rearrangements and cell death. It is evident that continuation of the replication is essential. There are several solutions employed by the cells to achieve this; they were best examined in *Saccharomyces cerevisiae*. In DNA damage tolerance pathways, Rad18 is one of the most important proteins. There are two mechanisms involved: one is *translesion synthesis* (TLS), during which an alternative polymerase takes the place of the replicative one. It has a larger active site and is capable of incorporating nucleotides opposite the damaged site, but these enzymes often make mistakes and insert the wrong nucleotide into the DNA, leading to the generation of point mutations. Polymerase η is capable of performing error-free copying, as it incorporates A-A opposite the T-T dimers caused by the UV irradiation, so point mutations are not generated. The other possible mechanism is *fork reversal*, during which the newly synthesised DNA strand serves as a template for replication. This is also an error-free manner of replication fork rescue. The stalled replication fork can be rescued in a *recombination-dependent manner*, during which a homologous region is used as a template for DNA synthesis, mediated by the Rad51 protein. The choice of the pathway to be activated is tightly regulated, as it has consequences for the cell: for example, translesion synthesis is fast but in many cases error-prone, while recombination is precise but, is complicated and uses unstable, vulnerable structures.

The PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) and its posttranslational modifications have an important role in making this choice. Several posttranslational modifications of PCNA are known, but its ubiquitylation and SUMOylation have been studied the most. Ubiquitylation is dependent on the Rad18 protein. Monoubiquitylation of PCNA initiates the polymerase exchange; its polyubiquitylation the reversal of the replication fork. SUMOylation of PCNA inhibits the recombination-dependent pathway at the stalled replication fork.

Whereas it has been studied extensively in yeast, it is poorly known what exactly happens during pathway choice in human cells. In yeast cells, Srs2 regulates choice making in several ways. On the one hand it has an ATPase-dependent helicase activity, and it can dismantle the Rad51-nucleotide filaments and the D-loop structures, on the other hand, it interacts with SUMOylated PCNA and inhibits the extension of the D-loop structures. Thus, it stops the recombination pathway and gives way to the Rad18-dependent pathways. In cells, UV-derived replication fork stalling is mostly rescued by the Rad18-dependent pathways. If the Rad18 is absent from the cells, an alternative pathway, the recombination-mediated one, will rescue the stalled replication fork. If Srs2 is present in the cells, the recombination-dependent pathway is inhibited, so the cells show high sensitivity to UV irradiation. If Srs2 is absent, recombination is not inhibited, and it can rescue the stalled replication fork after UV-damage in Rad18 knock-out cells. These cells show higher survival rates for UV damage. In human cells, the choice making is much more complicated. There are several functional homologs of yeast Srs2 in human cells. The FBH1 and RECQL5 β proteins have helicase activity and they can dismantle the Rad51-nucleotide filaments. RTEL1 also has helicase activity, but it dismantles the helicase activity of the D-loops. It is known from previous studies that the PARI protein (PCNA-Associated Recombination Inhibitor) inhibits recombination and interacts with SUMO-PCNA, but its role and its exact mechanism in recombination has not been studied yet.

The main goal of our study was to determine the role of PARI and its interaction with SUMOylated PCNA in the regulation of recombinational events at stalled replication fork. During our work, we examined how the PARI protein regulates homologous recombination at the stalled replication fork and how it depends from SUMOylated PCNA. Similarly to yeast Srs2-experiments, we showed how the absence of PARI affected cell survival when Rad18 was absent employing an shRNA-based system. Regarding our results, the absence of PARI suppressed the UV sensitivity of RAD18-silenced cells. The explanation of this is very similar to the one observed in yeast: rescue of the replication fork after UV-damage is

mostly performed in a Rad18-dependent manner in cells. In the absence of Rad18, the recombination-dependent pathway takes its place. If PARI is present in cells, recombination is inhibited. If it is silenced, recombination becomes active and can rescue the replication fork in the absence of Rad18. Thus, the double-silenced cells will be less sensitive to UV-irradiation than the RAD18-silenced alone. The overexpression of PARI leads to the opposite effect in RAD18-silenced cells: the UV sensitivity of the cells is enhanced, as the stalled replication fork cannot be rescued either in a RAD18- or in a recombination-dependent manner. We showed with a GFP-based homologous recombination measurement system that the PARI protein inhibits homologous recombination events, which is independent from its helicase activity but is highly dependent on its PIP (PCNA-interacting peptide) and SIM (SUMO-interacting motif) domains. This result was strengthened by survival experiments, where the double point mutant (PIP/SIM) PARI suppressed the sensitivity of RAD18-depleted cells after UV treatment, as it could not inhibit homologous recombination. With microscopic analysis, we determined that the proper localization of PARI requires the PIP and the SIM domains and also its interaction with SUMO-PCNA. Via chromosomal aberration experiments, we showed that the overexpression (previously published that silencing) of PARI increases the number of aberrant chromosomes in the cells. PARI is required for the maintenance of genome stability. To study the exact biochemical action of the PARI protein, we employed a D-loop-based model system. We showed that the PARI protein inhibits the extension of the D-loops, however, in this system it was PCNA dependent, and SUMOylated PCNA did not have a determinative role in this, in contrast to the yeast Srs2 experiments, in which this activity was clearly SUMO-PCNA dependent. However, based on our cell biological experiments, SUMOylated PCNA has an important regulatory role in the localization of the protein, thus, our hypothesis is that the SUMOylation of PCNA has a role in the targeting of PARI to the stalled replication fork, while its interaction with PCNA is important for the inhibition of D-loop extension.

While in yeast the inhibition of recombination at stalled replication forks is performed by Srs2 "alone", in human cells, it is much more complex and is regulated by several proteins. The role of the PARI protein is that, together with SUMOylated PCNA, it inhibits the extension of the D-loop, thus stopping the recombination event. This way, it facilitates the Rad18-dependent pathway of rescuing UV-derived replication fork stalling. PARI keeps a balance between the alternative pathways at stalled replication forks.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszöntetet mondok témavezetőmnnek, **Dr. Haracska Lajosnak**, azért, hogy 2011 óta tagja lehetek a csoportjának, hogy lehetőséget biztosított több kutatási téma kidolgozására, számos technika elsajátítására, és magas színvonalú szakmai fejlődésre.

Köszönettel tartozom **Dr. Burkovics Péternek**, a sok-sok szakmai és baráti tanácsért, a dolgozatomban nyújtott segítségéért, és a rengeteg támogatásért, amit tőle kaptam.

Köszönöm **Dr. Juhász Szilviának**, hogy az egyetemi éveim alatt segített elsajátítani a technikákat, és elindított a kutatói pályán.

Köszönetet mondok **Kovács Katalinnak** és **Nótári Péternének** a sok technikai segítségért és gyakorlati tudásért, amivel segítettek a mindennapjaim.

Köszönöm **Tick Gabriellának** a publikációk és egyéb közlemények, pályázatok megírásában nyújtott hatalmas segítségét.

Köszönöm **Dudás Katának** a sok támogatást és vidám pillanatot, amit tőle kaptam az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom **Dr. Székvölgyi Lórántnak** és **Dr. Pankotai Tibornak**, hogy elvállalták a dolgozatom bírálatát.

Köszönettel tartozom külföldi partnereinknek, különösen **Dr. Lumir Krejcinek**, aki nélkül nem jöhetett volna létre a dolgozatom alapjául szolgáló publikáció.

Köszönöm középiskolai tanárainknak, **Máriás Ildikónak** és, **Rózsa Sipos Mónikának**, hogy megszerettették velem a természettudományokat, és elindítottak ezen az úton.

Köszönetet mondok a csoportunk minden jelenlegi és korábbi tagjának, akik valamilyen módon támogattak.

Köszönettel tartozom a **Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet** vezetőinek és minden tagjának.

Köszönöm a családomnak, **Hegedűs Dánielnek** és **Hegedűs Rékának** a rengeteg támogatást.

A dolgozat elkészítéséhez a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00024 és GINOP-2.3.2-15-2016-00026) valamint a Horizont 2020 kutatási és innovációs program (támogatási megállapodás száma: 739593) nyújtott támogatást.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

MTMT szám: 10053349

Összesített IF: 39,058

A dolgozat alapját képező közlemény

Péter Burkovics*, Lili Döme*, Szilvia Juhász, Veronika Altmannova, Marek Sebesta, Martin Pacesa, Kasper Fugger, Claus Storgaard Sorensen, Marietta Y.W.T. Lee, Lajos Haracska, Lumir Krejci: The PCNA-associated protein PARI negatively regulates homologous recombination via the inhibition of DNA repair synthesis. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 44 : 7 pp. 3176-3189. , 14 p. (2016), MTMT: 3028656, IF: 10,162

*Megosztott első szerző

További közlemények

Gabriel Fenteany, Paras Gaur, Lili Hegedűs, Kata Dudás, Ernő Kiss, Edit Wéber, László Hackler, Tamás Martinek, László G. Puskás, Lajos Haracska: Multilevel structure–activity profiling reveals multiple green tea compound families that each modulate ubiquitin-activating enzyme and ubiquitination by a distinct mechanism. SCIENTIFIC REPORTS 9 : 1 Paper: 12801 , 16 p. (2019), MTMT: 30791081, IF: 4,525

Cong K Peng M, NJ Panzarino, S Nayak, J Calvo, B Deng, LJ Zh, M Morocz, L Hegedus, L Haracska, SB Cantor: Opposing Roles of FANCI and HLF Protect Forks and Restrains Replication during Stress, CELL REPORTS 24 : 12 pp. 3251-3261., 11 p. (2018), MTMT: 27695954, IF: 8,032

Csilla Brasko, Kevin Smith, Csaba Molnar, Nora Farago¹, Lili Hegedus, Arpad Balind, Tamas Balassa, Abel Szkalisity, Farkas Sukosd, Katalin Kocsis, Balazs Balint⁶ Lassi Paavolainen, Marton Z. Enyedi, Istvan Nagy, Laszlo G. Puskas, Lajos Haracska, Gabor Tamas, Peter Horvath: Intelligent image-based in situ single-cell isolation, NATURE COMMUNICATIONS 9 : 1 Paper: 226 , 7 p. (2018), MTMT: 3318793, IF: 11,878

Ágnes Tóth*, Lili Hegedűs *, Szilvia Juhász, Lajos Haracska, Péter Burkovics: The DNA-binding box of human SPARTAN contributes to the targeting of Pol η to DNA damage sites. DNA REPAIR 49 pp. 33-42., 10 p. (2017); MTMT: 3140736; IF: 4,461

*Megosztott első szerző

Publikáció alatt álló közlemények

Szilvia Juhász, Ágnes Tóth, Gábor M. Harami, János Pálinkás, Lili Hegedűs , Enikő Sajben-Nagy, Szabolcs Bene, Lajos Pintér, Lajos Haracska, Mihály Kovács, Péter Burkovics: The human WRNIP1 protein regulates G4 replication in a Pif1-dependent manner

Qiuzhen Li, Mónika Mórocz, Szilvia Juhász, Lili Hegedűs, Alexandra Gráf, Ádám Sánta, Gaurav Sharma, Péter Burkovics, Ernő Kiss, Lajos Haracska: FAN1 and Pol eta constitute a pathway for replicational bypass of DNA interstrand crosslinks under the control of RAD18-dependent PCNA-ubiquitylation

Lili Hegedűs*, Kata Dudás*, Qiuzhen Li, Indra Balogh, Gabriella Tick, Lajos Haracska: Ubiquitylate for tolerance: regulatory mechanisms at the stalled replication fork

*Megosztott első szerző

12. IRODALOMJEGYZÉK

1. Dexheimer, T. S. DNA Repair Pathways and Mechanisms. (2013) doi:10.1007/978-94-007-4590-2.
2. Roos, W. P., Thomas, A. D. & Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 20–33 (2016).
3. Tubbs, A. & Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **168**, 644–656 (2017).
4. Hoeijmakers, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1475–1485 (2009).
5. Menck, C. F. M. & Munford, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet. Mol. Biol.* **37**, 220–233 (2014).
6. Hoeijmakers, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366–374 (2001).
7. Wallace, S. S. Base excision repair: A critical player in many games. *DNA Repair (Amst)*. **19**, 14–26 (2014).
8. Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W. & Hoeijmakers, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 465–481 (2014).
9. Lehmann, A. R., McGibbon, D. & Stefanini, M. Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J. Rare Dis.* **6**, 70 (2011).
10. Ajoy C. Karikkineth, Morten Scheibye-Knudsen, Elayne Fivenson, Deborah L. Croteau, V. A. B. Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathways. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2016).
11. Li, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85–98 (2008).
12. Zhang, H., Xiong, Y. & Chen, J. DNA-protein cross-link repair: What do we know now? *Cell Biosci.* **10**, 1–10 (2020).
13. Hashimoto, S., Anai, H. & Hanada, K. Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders. *Genes Environ.* **38**, 1–8 (2016).
14. Su, X. & Huang, J. The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair. *Protein Cell* **2**, 704–711 (2011).

15. Lieber, M. R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N. & Tsai, A. G. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell. Biochem.* **50**, 279–296 (2014).
16. Syed, A. & Tainer, J. A. The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 263–294 (2018).
17. Kai Rothkamm, Stephen Barnard, Jayne Moquet, Michele Ellender, Zohaib Rana, S. B.-R. DNA Damage Foci: Meaning and Significance. *Environ. Mol. Mutagen.* **405**, 391–405 (2010).
18. Ruff, S. E., Logan, S. K., Garabedian, M. J. & Huang, T. T. Roles for MDC1 in cancer development and treatment. *DNA Repair (Amst)*. **95**, 102948 (2020).
19. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. & Zhao, X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5795–5818 (2012).
20. Carr, A. M. & Lambert, S. Replication stress-induced genome instability: The dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* **425**, 4733–4744 (2013).
21. Bishop, A. J. R. & Schiestl, R. H. Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: Environmental and genetic effects. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2427–2434 (2000).
22. Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 698–714 (2019).
23. O'Donnell, M., Langston, L. & Stillman, B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, 1–14 (2013).
24. Bell, S. P. & Dutta, A. DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333–374 (2002).
25. Johansson, E. & Dixon, N. Replicative DNA polymerases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
26. Lambert, S. & Carr, A. M. Replication stress and genome rearrangements: Lessons from yeast models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 132–139 (2013).
27. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).

28. Sale, J. E., Lehmann, A. R. & Woodgate, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 141–152 (2012).
29. Prakash, S., Johnson, R. E. & Prakash, L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: Specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 317–353 (2005).
30. Johnson, R. E., Haracska, L., Prakash, S. & Prakash, L. Role of DNA Polymerase η in the Bypass of a (6-4) TT Photoproduct. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3558–3563 (2001).
31. Gratchev, A., Strein, P., Utikal, J. & Goerdt, S. Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant. *Exp. Dermatol.* **12**, 529–536 (2003).
32. Wei Yang and Yang Gao. Translesion and repair DNA polymerases: diverse structure and mechanism. *Annu Rev Biochem.* **87**, 239–261 (2018).
33. Marians, K. J. Lesion Bypass and the Reactivation of Stalled Replication Forks. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 217–238 (2018).
34. Hasty, P. & Montagna, C. Chromosomal rearrangements in cancer: Detection and potential causal mechanisms. *Mol. Cell. Oncol.* **1**, 1–12 (2014).
35. Taghian, D. G. & Nickoloff, J. A. Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6386–6393 (1997).
36. Li, X. & Heyer, W. D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* **18**, 99–113 (2008).
37. Lambert, S. *et al.* Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell* **39**, 346–359 (2010).
38. Chang, D. J. & Cimprich, K. A. DNA damage tolerance: When it's OK to make mistakes. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 82–90 (2009).
39. Hendel, A. *et al.* PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
40. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629-640. (1997).
41. Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* **129**, 665–679 (2007).
42. Naryzhny, S. N. & Lee, H. The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **279**, 20194–20199 (2004).

43. Lee, K. Y. & Myung, K. PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol. Cells* **26**, 5–11 (2008).
44. Zhang, Z. *et al.* Structure of monoubiquitinated PCNA. *Cell Cycle* **11**, 2128–2136 (2012).
45. Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1695**, 55–72 (2004).
46. Andersen, P. L., Xu, F. & Xiao, W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* **18**, 162–173 (2008).
47. Unk, I. *et al.* Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3768–3773 (2008).
48. Unk, I., Hajdú, I., Blastyák, A. & Haracska, L. Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)*. **9**, 257–267 (2010).
49. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
50. Su, H. L. & Li, S. S. L. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* **296**, 65–73 (2002).
51. Wilson, V. G. Introduction to Sumoylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **963**, 171–184 (2017).
52. Wei, W. *et al.* A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 454–459 (2008).
53. Hay, R. T. SUMO: A history of modification. *Mol. Cell* **18**, 1–12 (2005).
54. Watts, F. Z. Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)*. **5**, 399–403 (2006).
55. Welchman, R. L., Gordon, C. & Mayer, R. J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 599–609 (2005).
56. Haracska, L., Torres-Ramos, C. A., Johnson, R. E., Prakash, S. & Prakash, L. Opposing Effects of Ubiquitin Conjugation and SUMO Modification of PCNA on Replicational Bypass of DNA Lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4267–4274 (2004).
57. Bi, X. Mechanism of DNA damage tolerance. *World J. Biol. Chem.* **6**, 48 (2015).

58. Burkovics, P. *et al.* Srs2 mediates PCNA-SUMO-dependent inhibition of DNA repair synthesis. *EMBO J.* **32**, 742–755 (2013).
59. Rong, L. & Klein, H. L. Purification and characterization of the SRS2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 1252–1259 (1993).
60. Van Komen, S., Reddy, M. S., Krejci, L., Klein, H. & Sung, P. ATPase and DNA Helicase Activities of the *Saccharomyces cerevisiae* Anti-recombinase Srs2. *J. Biol. Chem.* **278**, 44331–44337 (2003).
61. Burgess, R. C. *et al.* Localization of recombination proteins and Srs2 reveals anti-recombinase function in vivo. *J. Cell Biol.* **185**, 969–981 (2009).
62. Veaute, X. *et al.* The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* **423**, 309–312 (2003).
63. Antony, E. *et al.* Srs2 Disassembles Rad51 Filaments by a Protein-Protein Interaction Triggering ATP Turnover and Dissociation of Rad51 from DNA. *Mol. Cell* **35**, 105–115 (2009).
64. Armstrong, A. A., Mohideen, F. & Lima, C. D. Recognition of SUMO-modified PCNA requires tandem receptor motifs in Srs2. *Nature* **483**, 59–65 (2012).
65. Pfander, B., Moldovan, G. L., Sacher, M., Hoege, C. & Jentsch, S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436**, 428–433 (2005).
66. Fugger, K. *et al.* Human Fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. *J. Cell Biol.* **186**, 655–663 (2009).
67. Simandlova, J. *et al.* FBH1 helicase disrupts RAD51 filaments in vitro and modulates homologous recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 34168–34180 (2013).
68. Paliwal, S., Kanagaraj, R., Sturzenegger, A., Burdova, K. & Janscak, P. Human RECQ5 helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by synthesis-dependent strand annealing. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2380–2390 (2014).
69. Uringa, E. J., Youds, J. L., Lisaingo, K., Lansdorp, P. M. & Boulton, S. J. RTEL1: An essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1647–1655 (2011).
70. Barber, L. J. *et al.* RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell* **135**, 261–271 (2008).

71. George-Lucian Moldovan, Donniphath Dejsuphong, Mark I. R. Petalcorin, Kay Hofmann, Shunichi Takeda, Simon J. Boulton, and A. D. D. Inhibition of homologous recombination by the PCNA- interacting protein PARI. *Mol Cell*. **45**, 75–86 (2012).
72. Lianhua Piao, Hidewaki Nakagawa, Koji Ueda, Suyoun Chung, Kotoe Kashiwaya, Hidetoshi Eguchi, Hiroaki Ohigashi, Osamu Ishikawa, Yataro Daigo, Koichi Matsuda, Y. N. C12orf48, Termed PARP-1 Binding Protein, Enhances Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Activity and Protects Pancreatic Cancer Cells from DNA Damage. *Cancer* **396**, 389–396 (2011).
73. Mochizuki, A. L. & Ami Katanaya, Eri Hayashi, Mihoko Hosokawa, Emiko Moribe, Akira Motegi, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Gen Kondoh, Hitomi Watanabe, Norio Nakatsuji, S. C. PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice. **37**, 1–21 (2017).
74. Kevin W. O'Connor, Donniphath Dejsuphong¹, Eunmi Park, Claudia M. Nicolae, Alec C. Kimmelman, Alan D. D'Andrea, and G.-L. M. PARI overexpression promotes genomic instability and pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res.* **73**, 2529–2539 (2013).
75. Zhang, Y. *et al.* PARI functions as a new transcriptional target of FOXM1 involved in gastric cancer development. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 531–541 (2018).
76. Yu, B. *et al.* Overexpression of PARPBP Correlates with Tumor Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* **64**, 2878–2892 (2019).
77. Zoltán Ivics, Meng Amy Li, Lajos Mátés, Jef D. Boeke, Allan Bradley, and Z. I. Transposon-mediated Genome Manipulations in Vertebrates. *Nat Methods* **6**, 415–422.
78. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. & Stark, J. M. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.* **4**, (2008).
79. Bo Chen, Jianguo Lai, Danian Dai, Rong Chen, Ning Liao, G. G. and H. T. PARPBP is a prognostic marker and confers anthracycline resistance to breast cancer. *Ther. Adv. Vaccines* **9**, 259–261 (2018).
80. Sebesta, M., Burkovics, P., Haracska, L. & Krejci, L. Reconstitution of DNA repair synthesis in vitro and the role of polymerase and helicase activities. *DNA Repair (Amst)*. **10**, 567–576 (2011).